

Direction des bibliothèques

AVIS

Ce document a été numérisé par la Division de la gestion des documents et des archives de l'Université de Montréal.

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

This document was digitized by the Records Management & Archives Division of Université de Montréal.

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal

Étude de l'impact d'une intervention d'observance sur le
développement de la résistance aux antirétroviraux au Mali
et au Burkina Faso

Par
Sylla Mohamed

Sous la direction de
Dr Cécile Tremblay

Département de microbiologie et immunologique
Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Maîtrise es Sciences (M. Sc.)
en Microbiologie

2007

© Mohamed Sylla, 2007



Université de Montréal

Faculté des Etudes supérieures

Ce mémoire intitulé :

Étude de l'impact d'une intervention d'observance sur le
développement de la résistance aux antirétroviraux au Mali
et au Burkina Faso

Présenté par :
Sylla Mohamed

sera évalué par un jury composée des personnes suivantes :

| | |
|---------------------------|--|
| Président rapporteur : | D ^r Hugo Soudeyns |
| Directrice de recherche : | Pr. Cécile Tremblay |
| Membre du jury : | Pr. Cécile Tremblay |
| Membre du jury : | D ^{re} Madeleine Ravaoarinoro |

Mémoire accepté le : _____

RESUME

L'utilisation de multithérapies antirétrovirales en Afrique a connu beaucoup d'obstacles. Mis à part le problème de coût des médicaments et réactifs, les ressources humaines inadéquates, les difficultés de prescriptions des antirétroviraux (ARV), l'on est de plus en plus confronté aux problèmes de l'observance et surtout à l'émergence de souches virales résistantes. Contrairement à la Côte d'Ivoire qui bénéficie d'un programme de prise en charge des personnes vivant avec le VIH (PEPFAR) et où une étude a été déjà menée sur les phénomènes de résistances, aucune étude n'a encore été effectuée dans des pays comme le Burkina Faso et le Mali où les programmes de thérapie antirétrovirale commencent à s'installer.

Comme les ressources des pays en voie de développement ne permettent pas d'effectuer un test de résistance génotypique chez tous les patients traités, nous avons étudié dans une cohorte de 800 patients recevant des antirétroviraux, l'émergence de souche virale résistante. Dans un premier temps, nous avons évalué la réponse au traitement en mesurant la charge virale plasmatique. Chez les sujets n'ayant pas répondu au traitement, une intervention d'observance a été effectuée. Par la suite, un mois après, une deuxième charge virale de ces patients a été mesurée pour évaluer la réponse à l'intervention d'observance. Chez les patients qui n'auront toujours pas répondu au traitement, un génotypage a été effectué sur les souches recueillies avant et après l'intervention afin d'évaluer l'émergence de résistance, permettant ainsi de développer un algorithme d'intervention qui a pour but de minimiser l'émergence de résistance grâce à un monitoring adapté à des pays à ressources limitées.

Mots clés : sous types du VIH, mutations de résistance, antirétroviral, observance.

LISTE DES PRINCIPALES ABREVIATIONS

ADN : Acide désoxyribonucléique

ARN : Acide ribonucléique

ARNm : ARN messenger

ARV : Antirétroviraux

AZT : 3'-azido-2',3'-déoxythymidine (zidovudine)

CCR5 : Récepteur aux chimiokines 5

CD4 : Cluster of differentiation 4, protéine de différenciation 4

CD8 : Cluster of differentiation 8, protéine de différenciation 8

cpx : Complexe

CRF : Circulating recombinant form, forme de recombinants circulants

CXCR4 : Récepteur aux chimiokine 4

DNTP : Déoxyribonucleotide triphosphate

env : Gène codant pour les protéines de l'enveloppe virale

gag : Gène codant la matrice, la capside, la nucléocapside (antigène)

gp120 : Glycoprotéine de l'enveloppe de 120kD (= SU)

gp41 : Glycoprotéine de l'enveloppe de 41kD (= TM)

HAART : Highly active antiretroviral therapy

HR2 : Heptad repeat region 2

HTLV : Human T lymphotropic virus

IF : Inhibiteur de fusion

IL : Interleukine

IP : Inhibiteur de protéase

IN : Intégrase

INTI : Inhibiteurs nucléosidiques de la transcriptase inverse

INNTI : Inhibiteurs non nucléosidique de la transcriptase inverse

KDa : Kilodalton

LTR : Long terminal repeat, séquences répétées terminales

MHC ou **CMH** : Major histocompatibility complex ou complexe majeur d'histocompatibilité

MDR : Multi drug resistance

ML : Maximum likelihood

nef : Gène codant pour la protéine Nef (Negative Factor, facteur négatif)

NJ : Neighbor joining, méthode des voisins proches

nm : Nanomètre

OMS : Organisation mondiale de la santé

p17 : Protéine de la matrice (= MA)

p24 : Protéine de la capside (= CA)

p7 : Protéine de la nucléocapside (= NC)

PBMC : Peripheral blood mononuclear cells, cellules mononucléées du sang périphérique

PEPFAR : President's emergency plan for AIDS relief.

PCR : Polymerase chain reaction, amplification par polymérisation en chaîne

pol : Gène codant les enzymes du VIH

RT-PCR : Reverse transcriptase PCR, PCR par transcriptase inverse

SIDA : Syndrome de l'immunodéficience acquise

SIV : Simian immunodeficiency virus, Virus d'immunodéficience simienne

SIVcpz : SIV de chimpanzé

SIVsm : SIV de mangabey

TAM : Thymidine associated mutation

TAR : Trans acting region, région de trans-activation par Tat

tat : Gène codant pour la protéine Tat (Trans-Activator, trans-activateur)

TI : Transcriptase inverse

URF : Unique recombinant form

ONUSIDA : Organisation des Nations Unies pour le SIDA

VIH : Virus de l'immunodéficience humaine

LES ACIDES AMINES

| | | |
|----------|-----|------------------|
| A | Ala | Alanine |
| C | Cys | Cystéine |
| D | Asp | Acide aspartique |
| E | Glu | Acide glutamique |
| F | Phe | Phénylalanine |
| G | Gly | Glycine |
| H | His | Histidine |
| I | Ile | Isoleucine |
| K | Lys | Lysine |
| L | Leu | Leucine |
| M | Met | Méthionine |
| N | Asn | Asparagine |
| P | Pro | Proline |
| Q | Gln | Glutamine |
| R | Arg | Arginine |
| S | Ser | Sérine |
| T | Thr | Thréonine |
| V | Val | Valine |
| W | Trp | Tryptophane |
| Y | Tyr | Tyrosine |

LISTES DES TABLEAUX

Tableau 1 : Classification des CRF du VIH-1 et leur origine.....25

Tableau 2 : Association recommandés pour le traitement initial d'un patient VIH.....32

Article :

Table 1 : Patients' characteristics.....85

LISTE DES FIGURES

| | |
|---|----|
| Figure 1 : Epidémiologie du VIH dans le monde en 2006..... | 5 |
| Figure 2 : Schéma organisationnel du VIH..... | 9 |
| Figure 3 : Structure génomique de l'ADN proviral VIH-1..... | 10 |
| Figure 4 : Cycle réplcatif du VIH..... | 14 |
| Figure 5 : Transcription de l'ARN viral..... | 16 |
| Figure 6 : Modèle de transmission du SIV à l'homme..... | 23 |
| Figure 7 : Classification des sous-types du VIH-1..... | 24 |
| Figure 8 : Répartition géographique des VIH-1 dans le monde..... | 29 |
| Figure 9 : Classification des sous-types du VIH-2..... | 30 |

Article

| | |
|--|----|
| Figure 1 : NRTI and NNRTI resistance mutations identified in 46 isolates..... | 86 |
| Figure 2 : Distribution of NRTI and NNRTI drugs resistance mutations according to subtype..... | 87 |
| Figure 3 : Phylogenic Analysis of 46 viral sequences..... | 88 |
| Figure 4 : ML tree of all AG and AGK sequences from this study along with the most closely related from the LANL HIV database..... | 89 |

REMERCIEMENTS ET DEDICACES

Je dédie ce mémoire à ma mère.

Je voudrai adresser mes remerciements sincères aux personnes citées plus bas à travers l'illustration de deux proverbes africains.

« le baobab ne grandit jamais avec les piquants. »

« Celui qui est irrespectueux et pas reconnaissant de ses instructeurs, l'ignorance lui restera »

- Merci à vous, Pr. Cécile Tremblay. Vous m'avez fait confiance, accepté dans votre laboratoire, soutenu dans mes moments les plus difficiles. Merci pour votre patience . Vous faites de moi un exemple dans le cadre du renforcement des capacités par une formation adéquate des jeunes des pays du Sud.
- Un grand merci au Pr. Vinh-Kim N'guyen pour le soutien moral et matériel. Vous avez toujours cru en moi et exhorté à donner le meilleur de moi-même à des moments où le découragement et le désir de tout abandonner me gagnaient.
- Je n'aurai pas de mots pour te traduire ma reconnaissance infinie à toi Annie Chamberland, pour ta supervision au laboratoire et tes conseils tout au long de mon cycle. Merci pour ta patience, tes mots d'encouragement et ton engouement à toujours donner un coup de main aux autres.
- Merci à toi Geneviève Bélanger Jasmin pour ta contribution à ma formation
- Un grand merci à toutes ces personnes qui à un moment donné ont contribué à mon travail. Je citerai le personnel du laboratoire (Yi Wei, Asin Milan Odalis), Julie Fontaine, Hawley, Daniel Tremblay-Sher, Nima Machouf, Catherine Boileau.
- Enfin, je ne voudrai surtout pas oublier tous ces collaborateurs africains au Burkina Faso et au Mali pour leur dévouement et leur engagement. Un merci particulier au Pr. Pascal Niamba du Burkina et au Dr Souleymane Ag-Boubacrine du Mali

TABLE DES MATIERES

| | |
|---|------|
| RESUMÉ..... | iii |
| LISTES DES ABREVIATIONS..... | v |
| LES ACIDES AMINÉS..... | vii |
| LISTE DES TABLEAUX..... | viii |
| LISTE DES FIGURES..... | ix |
| REMERCIEMENTS ET DEDICACES..... | x |
| | |
| 1. INTRODUCTION..... | 1 |
| 1.1 Introduction générale..... | 2 |
| 1.2 Epidémiologie..... | 4 |
| 1.2.1 Dans le monde..... | 4 |
| 1.2.2 En Asie..... | 4 |
| 1.2.3 En Afrique..... | 6 |
| 1.3 Le VIH..... | 7 |
| 1.3.1 Généralités sur le VIH..... | 7 |
| 1.3.1.1 Classification..... | 7 |
| 1.3.1.2 Le génome Viral..... | 10 |
| 1.3.1.3 Les protéines virales..... | 12 |
| 1.3.1.4 La transcriptase inverse en particulier..... | 13 |
| 1.3.2 Le cycle réplcatif du VIH..... | 14 |
| 1.3.3 Modes de transmission du VIH..... | 18 |
| 1.4 Diversité génétique du VIH..... | 19 |
| 1.4.1 Cause de la diversité génétique du VIH-1 : variabilité génétique du VIH-1..... | 19 |

| | | |
|-----------|--|----|
| 1.4.1.1 | La faible fidélité de la Transcriptase Inverse (TI)..... | 19 |
| 1.4.1.2 | Le cycle réplicatif..... | 19 |
| 1.4.1.3 | La recombinaison génétique..... | 20 |
| 1.4.1.4 | La pression de sélection..... | 21 |
| 1.4.2 | La diversité génétique – origine..... | 22 |
| 1.4.3 | Classification des sous types du VIH..... | 24 |
| 1.4.3.1 | Le VIH-1..... | 24 |
| 1.4.3.2 | Le VIH-2..... | 30 |
| 1.5 | Thérapeutique antirétrovirale et résistance aux antirétroviraux..... | 31 |
| 1.5.1 | Thérapeutique antirétrovirale..... | 31 |
| 1.5.1.1 | Principes et définition..... | 31 |
| 1.5.1.2 | Les inhibiteurs de la transcriptase inverse..... | 33 |
| 1.5.1.3 | Les inhibiteurs de la protéase (IP)..... | 35 |
| 1.5.1.4 | Les inhibiteurs de fusion..... | 36 |
| 1.5.2 | Le traitement antirétroviral..... | 38 |
| 1.5.2.1 | Objectifs du traitement..... | 38 |
| 1.5.2.2 | Stratégies de traitement..... | 39 |
| 1.5.2.3 | L'échec thérapeutique..... | 40 |
| 1.5.3 | Résistance aux antirétroviraux..... | 42 |
| 1.5.3.1 | La résistance aux inhibiteurs de la TI | 44 |
| 1.5.3.1.1 | Les mutations de résistance aux INTI..... | 44 |
| 1.5.3.1.2 | Les mutations de résistances aux Inhibiteurs non nucléosidiques de la TI..... | 49 |
| 1.5.3.2 | La résistance aux IP..... | 49 |

| | | |
|-----------|--|-----|
| 1.5.3.2.1 | Les mutations de résistance aux IP..... | 49 |
| 1.5.3.3 | La résistance aux IF..... | 53 |
| 1.5.4 | Impact de la variabilité génétique sur la résistance aux ARV... | 54 |
| 1.5.4.1 | Sensibilité naturelle des isolats de VIH-1 de sous-type non B et du VIH-2..... | 54 |
| 1.5.4.1.1 | Sensibilité naturelle des sous-types VIH-1 non B..... | 54 |
| 1.5.4.1.2 | Sensibilité naturelle du VIH-2..... | 56 |
| 1.5.4.2 | Développement des mutations de résistance chez les isolats VIH-1 non B et VIH-2..... | 57 |
| 1.5.4.2.1 | Développement des mutations de résistance chez les isolats non B..... | 57 |
| 1.5.4.2.2 | Développement de la résistance pour le VIH-2..... | 60 |
| 1.5.4.3 | La résistance primaire aux antirétroviraux..... | 61 |
| 2. | Résultat : Article : Characterization of drug resistance in a cohort of subjects on antiretroviral therapy infected with HIV-1 CRF02_AG and AGK subtypes in Mali and Burkina Faso..... | 63 |
| 3. | Discussion..... | 90 |
| 4. | Conclusion..... | 98 |
| 5. | Bibliographie..... | 100 |
| Annexes | | |

1- INTRODUCTION

1.1 Introduction générale

Le SIDA est la plus importante épidémie mondiale depuis la peste noire du Moyen-Âge. Elle dépasse en gravité la pourtant fameuse grippe espagnole de 1918. On peut estimer que le nombre de décès directement lié au SIDA dépassera celui de la 2ème guerre mondiale pourtant bien meurtrière. Mais c'est le tiers-monde qui paie le prix le plus fort avec les taux les plus élevés de personnes atteintes par la maladie. Particulièrement en Afrique, on parlera de catastrophe humaine avec pour corollaires, la pauvreté, les guerres, les famines et des milliers d'orphelins.

C'est dans ce contexte que s'est accentuée, dans les pays en voie de développement, la mise en place d'infrastructures de traitement antirétroviral, avec tout d'abord les programmes de diminution du risque de transmission mère-enfant et, par la suite, les programmes de prise en charge thérapeutiques chez la population générale, notamment les multithérapies antirétrovirales. Mais leur utilisation en Afrique a connu beaucoup d'obstacles. Mis à part le problème de coût des médicaments et des analyses de laboratoire nécessaires au suivi des patients, les ressources humaines inadéquates, la complexité de prescription des antirétroviraux (ARV), on est de plus en plus confronté aux problèmes de l'observance et surtout à l'émergence de souches virales résistantes. À l'exception de la Côte d'Ivoire qui bénéficie d'un programme de prise en charge des personnes vivant avec le VIH (PEPFAR) et où une étude a été déjà menée sur les phénomènes de résistances, aucune étude n'a encore été effectuée dans des pays comme le Burkina Faso et le Mali où les programmes de thérapie antirétrovirale commencent à s'installer. Notre étude porte essentiellement donc sur la caractérisation, l'analyse et

l'interprétation des mutations de résistance pour des patients enregistrés dans une cohorte au Mali et au Burkina Faso et ayant échoué la thérapie. À cela s'est intégrée une étude épidémiologique des sous-types de VIH dans ces régions et les pages suivantes révéleront la méthodologie qui a été mise en place.

1.2 Épidémiologie

1.2.1 Dans le monde

Selon le rapport de l'ONUSIDA paru en décembre 2006, 39,5 millions de personnes vivent avec le VIH soit 37,2 millions d'adultes (avec une proportion de 17,7 millions de femmes) et 2,3 millions d'enfants de moins de 15 ans. 4,3 millions de nouvelles infections chaque année, soit 14 000 par jour et 10 par minute. Environ 2 000 enfants sont infectés par jour pour un total de 530 000 enfants nouvellement infectés en 2006.

Vingt millions de personnes sont décédées suite au sida depuis le début de l'épidémie, 8 500 malades du SIDA décèdent chaque jour, soit 6 par minute. 1 350 enfants décèdent du SIDA chaque jour. On estime à 2,9 millions le nombre de personnes décédées du VIH en 2006. 14 millions d'enfants sont orphelins suite au décès d'un ou de leurs deux parents suite au sida.

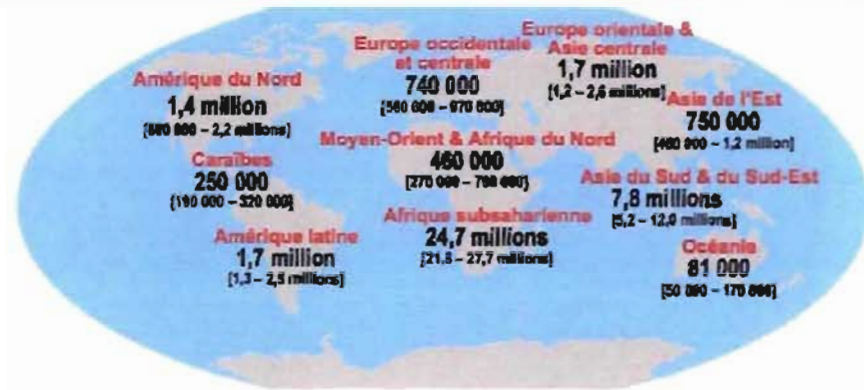
1.2.2 En Asie

En Asie, on dénombre 8,5 millions de séropositifs, 1,1 million de nouvelles infections chaque année et plus de 500 000 décès dus au SIDA.

Sur une population de 1 027 milliards de personnes qui vivent en Inde dont 495,7 millions de femmes et 531,3 millions d'hommes, on y dénombre, après l'Afrique du Sud, le plus grand nombre de personnes vivant avec le VIH. L'estimation est de

4,6 millions en 2006. La plupart des infections sont d'origine sexuelle, mais une faible proportion provient de la consommation de drogues injectables.

Adultes et enfants vivant avec le VIH, estimations en 2006



Total: 39,5 (34,1 – 47,1) millions

Nombre estimatif de décès par SIDA chez l'adulte et l'enfant en 2006



Total: 2,9 (2,5 – 3,5) millions

Source : ONUSIDA 2006.

Figure 1 : Épidémiologie du VIH dans le monde

1.2.3 En Afrique

En Afrique du Nord et au Moyen-Orient, on estime que 68 000 [41 000-220 000] personnes ont contracté le VIH en 2006, ce qui porte à 460 000 [270 000-760 000] le total des personnes vivant avec le virus dans la région. Le SIDA a entraîné le décès d'environ 36 000 [20 000-60 000] personnes au cours de l'année écoulée. La plupart des infections notifiées se sont produites chez des hommes, mais la proportion de femmes infectées est en hausse. (Kuehn, 2006; ONUSIDA, 2006b).

L'Afrique subsaharienne avec un peu plus de 10 % de la population mondiale, abrite plus de 60 % de toutes les personnes vivant avec le VIH – 24,7 millions [21,8 millions–27,7 millions]. En 2006, selon le rapport de l'ONUSIDA sur le point de l'épidémie, on estime à 2,8 millions [2,4 millions–3,2 millions] le nombre de personnes ayant contracté une infection, alors que 2,1 millions [1,8 millions–2,4 millions] d'adultes et d'enfants sont morts du SIDA. Parmi les jeunes de 15 à 24 ans, on estime que 4,6 % [4,2–5,5 %] des femmes et 1,7 % [1,3–2,2 %] des hommes vivent avec le VIH en 2006. On dénote, dans ce groupe, 3 millions de nouvelles contaminations chaque année. La prévalence chez les adultes de 15 et 49 ans est de 5,9 %. Il faut aussi noter qu'en Afrique subsaharienne, il y a plus de femmes infectées que d'hommes (57 % de femmes). Cette prévalence varie aussi entre villes et campagnes d'un même pays; d'un pays à un autre; d'une région à une autre (Afrique de l'Est, de l'Ouest, etc.).

1.3 Le VIH

1.3.1 Généralités sur le VIH

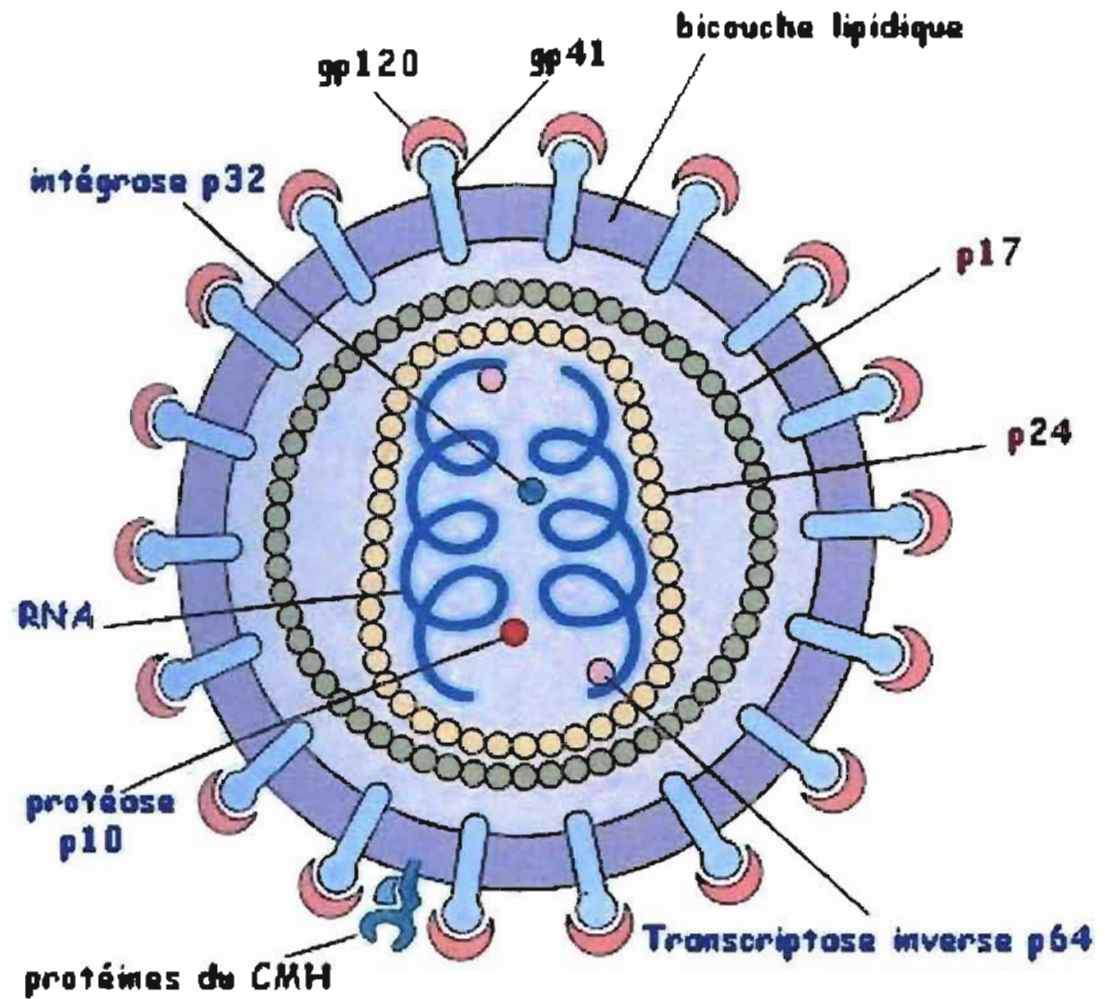
1.3.1.1 Classification

Le VIH a été isolé pour la première fois en 1983 par le professeur Luc Montagnier et son équipe. Il lui donne le nom de LAV (Lymphadenopathy Associated Virus). Ce virus est responsable du syndrome d'immunodéficience humaine (SIDA) identifié pour la première fois en 1981 chez des patients homosexuels à l'occasion de pneumopathies à *Pneumocystis carinii* maintenant nommé *jiroveci*.

Les VIH appartiennent à la famille des *Retroviridae* (Rétrovirus). Ce sont des virus à ARN, de 80 à 120 nm de diamètre, produits par bourgeonnement à la surface des cellules infectées. Ces particules sont formées d'une enveloppe externe et d'une nucléocapside dense. Cette enveloppe est constituée d'une double couche phospholipidique et de glycoprotéines transmembranaires gp41 et de surface gp120, le complexe gp41/gp120 se présentant sous forme généralement trimérique. Cette enveloppe entoure une protéine de matrice (p17) et une capsid composée de la protéine de core (p24) et d'une protéine de nucléocapside (p7). A l'intérieur de la capsid sont présents deux brins d'ARN viraux identiques, liés à la protéine de nucléocapside ainsi que les enzymes codées par le génome viral : la transcriptase inverse qui permet à partir du génome à ARN viral de synthétiser de l'ADN proviral double brin qui va s'intégrer dans le génome de la cellule infectée, la protéase et l'intégrase (voir figure 2).

Il existe deux sous familles de rétrovirus chez les mammifères. On distingue les Lentivirus et les orthoretrovirinae qui comprennent: les Alpharetrovirus, Betaretrovirus, Gammaretrovirus, Deltaretrovirus, Epsilonretrovirus. Les Spumavirus sont classés dans la sous-famille des Spumaretrovirinae. Selon les critères de pathogénie et de phylogénie, on distingue : les Oncovirus (Alpharetrovirus, Betaretrovirus, Gammaretrovirus, Deltaretrovirus, Epsilonretrovirus) associés à des leucémies ou des cancers tels que Human T-cell Leukemia (Virus HTLV-I et HTLV-II), les Lentivirus responsables d'infections d'évolution lente mais à terme fatale comme c'est le cas du VIH et les Spumavirus dont l'implication dans une pathologie humaine ou animale reste méconnue.

Selon leur morphologie, les Rétrovirus peuvent être classés en particules de type A, B, C et D. Le plus connu des rétrovirus impliqués dans les pathologies humaines est le VIH, responsable du SIDA. Il existe deux sous-types, le VIH-1 responsable de la pandémie et le VIH-2 rencontré surtout en Afrique de l'Ouest (Damond *et al.*, 2001). Des virus apparentés appelés SIV (simian immunodeficiency virus) ont été isolés chez des singes. Le SIVcpz isolé chez les chimpanzés semble lié au VIH-1 et le SIVsm isolé chez le mangabey enfumé est proche du VIH-2 (Peeters & Sharp, 2000). D'autres virus de l'immunodéficience sont retrouvés chez des bovins (bovine immunodeficiency virus), les félins (felin Immunodeficiency Virus).



Source : <http://www.inrp.fr/Acces/biotic/immuno/html/strucvih.htm>

Figure 2 : Schéma organisationnel du VIH

1.3.1.2 Le génome viral

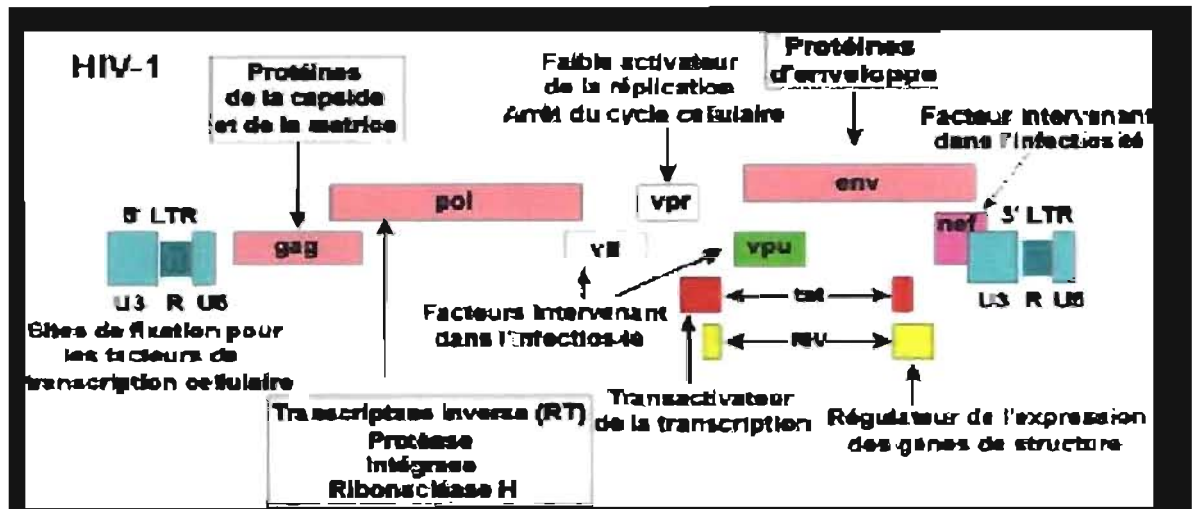


Figure 3 : Structure génomique de l'ADN proviral VIH-1. Tiré de « Traité de virologie médicale », M. Huraux, éditions Estem, 2003.

Le génome du VIH-1 a une longueur d'environ 9,2 Kb (figure 2). Il est constitué de trois gènes structuraux appelés *gag* (group specific antigen), *pol* (polymerase), *env* (enveloppe) et de gènes accessoires (*vif*, *vpr*, *tat*, *rev*, *nef*, *vpu*). Les gènes de structure codent les antigènes de la nucléocapside, les enzymes virales, et les protéines de surface du virion, respectivement.

Pour le VIH-1, les gènes *pol* et *gag* sont traduits en précurseurs polyprotéiques qui seront clivés en protéines matures et fonctionnelles. Les précurseurs *pol* (p55) et *gag-pol* (p160) sont les plus décrits pour ces gènes. Quant au gène *env*, il sera traduit en précurseur polyprotéique gp160 qui sera clivé en glycoprotéines membranaires gp120 et gp41. L'ADN proviral est flanqué aux extrémités 5' et 3' d'une séquence identique

U3-R-U5, LTR (long terminal repeat). Ces séquences comprennent les sites d'intégration qui vont permettre à l'ADN proviral de s'intégrer dans la cellule hôte, les sites d'initiation et de terminaison, le promoteur de la transcription (TATA box), et les séquences sur lesquelles vont agir les protéines de régulation.

Les gènes accessoires et régulateurs codent pour des protéines qui ont un rôle variable :

- *Vif* (p23) : vif « viral infectivity factor » joue un rôle dans l'infectiosité mais pas dans la production virale. La protéine module l'assemblage et la maturation des particules virales.
- *Vpr* (p15) : « viral protein R » joue un rôle dans la réplication en favorisant le transport nucléaire du complexe de préintégration virale, la transactivation des gènes cellulaires et la différenciation cellulaire.
- *tat* (p14) : tat code pour une protéine régulatrice. C'est un transactivateur de la transcription de l'ARNm.
- *rev* (p19) : c'est le second facteur de régulation nécessaire à l'expression du VIH. Cette protéine permet de transporter l'ARNm vers le cytoplasme, de le stabiliser et de permettre sa traduction.

- *nef* (p27) : la protéine *nef* est la plus immunogène des protéines accessoires. Elle est indispensable *in vivo* à la réplication virale et à la progression de la maladie. Elle induit une sous-régulation des CD4 et du CMH de classe I.

- *Vpu* (p16) : « viral protein U » favorise la dégradation des CD4 dans le réticulum endoplasmique et la libération dans le plasma des particules virales. Elle est impliquée dans la maturation de *Env*.

1.3.1.3 Les protéines virales

A partir des gènes *gag*, *pol* et *env*, des précurseurs polyprotéiques sont synthétisés dans la cellule infectée, où ils sont clivés en protéines internes par la protéase virale et en protéines d'enveloppe par des protéases cellulaires. Le gène *gag* synthétise un précurseur intracellulaire de 55 kilodaltons (KDa) nommé p55 et clivé en trois protéines constitutives de la nucléocapside :

p24 (24 Kda) : protéine majeure de la capside.

p17 (17 Kda) : phosphoprotéine N-terminale, protéine de matrice.

p15 (15 Kda) : nucléoprotéine C-terminale qui sera elle-même clivée au cours de la maturation en deux protéines p9 et p7.

1.3.1.4 La transcriptase inverse en particulier

La transcriptase inverse (RT) est une enzyme codée par le gène *pol* qui intervient en début de cycle. Elle se situe à l'intérieur de la capside, associée à une intégrase (IN, enzyme nécessaire à l'intégration de l'ADN proviral dans l'ADN cellulaire). La RT rétrotranscrit l'ARN viral en ADN. Elle a une activité polymérase ARN et ADN-dépendante. On dit de cette enzyme qu'elle a une faible fidélité permettant ainsi des erreurs lors de la copie de l'ADN dans le cycle. Elle a aussi une activité ribonucléase H permettant la destruction de l'ARN hybridé à l'ADN et une activité ADN polymérase-ADN dépendante (Starnes & Cheng, 1989). Par contre, elle ne possède pas d'activité 3'-5' exonucléasique qui sert à corriger les erreurs d'appariement qu'elle commet lors de la réplication virale (Roberts *et al.*, 1988). Le taux d'erreurs *in vivo* est évalué à une substitution pour 10000 bases par cycle réplcatif (Preston & Dougherty, 1996). Il en résulte que la population virale est un mélange en équilibre instable de virus génétiquement différents mais voisins : on parle de quasi-espèces, d'essaim de génomes viraux distincts, d'où vont émerger les variants antigéniques et les mutants résistants aux antiviraux.

1.3.2 Le cycle réplcatif du VIH

Le cycle viral commence par l'attachement des particules virales sur la cellule cible.

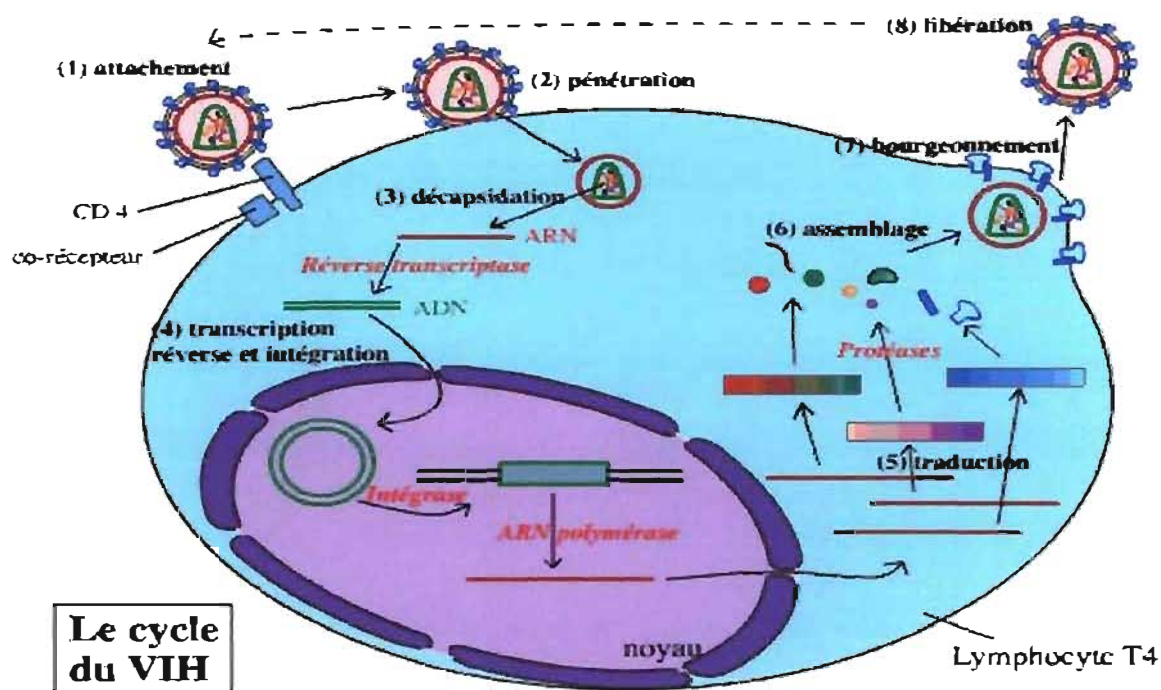


Figure 4 : Cycle réplcatif du VIH tiré de Vie – la biologie au lycée. Avril 2002. Gilles Furelaud.

(1) Attachement

Le virus se fixe sur la cellule-cible, en l'occurrence le lymphocyte T CD4⁺, par reconnaissance entre la protéine virale gp120 et la protéine CD4 du lymphocyte. Cette première étape de l'attachement est due à une interaction très forte entre la gp120 du côté viral et le récepteur cellulaire qui est l'extrémité de la molécule CD4 du côté cellulaire.

Une fois cette liaison établie, il s'ensuit un changement de conformation de la molécule gp120 qui permet d'exposer un site de liaison pour le co-récepteur (soit le CCR5 soit le CXCR4). Ce site de liaison est un feuillet de liaison (bridging sheet) du domaine interne et externe de gp120 situé près de la boucle V3. Les interactions de la gp120 avec le corécepteur induisent à nouveau un changement de conformation de la gp120, avec clivage de cette molécule et, fait important, dégagement de la gp41 et arrimage du peptide de fusion à l'extrémité n-terminal de gp41 dans la membrane cytoplasmique.

(2) Fusion

Suite à la pénétration du peptide de fusion dans la membrane cytoplasmique, les deux hélices de gp41 se replient sur elles-mêmes ce qui permet la fusion de la membrane cellulaire et la membrane du virus. La nucléocapside peut donc pénétrer à l'intérieur du cytoplasme de la cellule puis libère l'ARN viral dans le cytoplasme.

(3) Reverse transcription

Grâce à la TI virale, l'ARN viral servant alors de matrice est rétrotranscrit en ADN double brin. De manière plus précise, un ARNt (de transfert) d'origine cellulaire est intégré dans la particule virale et va servir d'amorce. L'initiation stimulée par la protéine Tat, commence par la synthèse du premier brin d'ADNc et se poursuit par l'élongation grâce à la TI. Cette dernière effectue en fait des sauts jusqu'aux séquences répétées U5 et U3, de telle sorte que le brin d'ADNc aura la séquence U3-R-U5 à chacune de ses extrémités (schéma ci-dessous). On aboutit alors à la formation d'une hélice

hybride ARN-ADN. L'ARN qui a servi de matrice pour la synthèse de l'ADNc est progressivement hydrolysé par une ARNase. La synthèse du 2^{ième} brin d'ADN se fait aussi grâce à la reverse transcriptase pour donner le provirus.

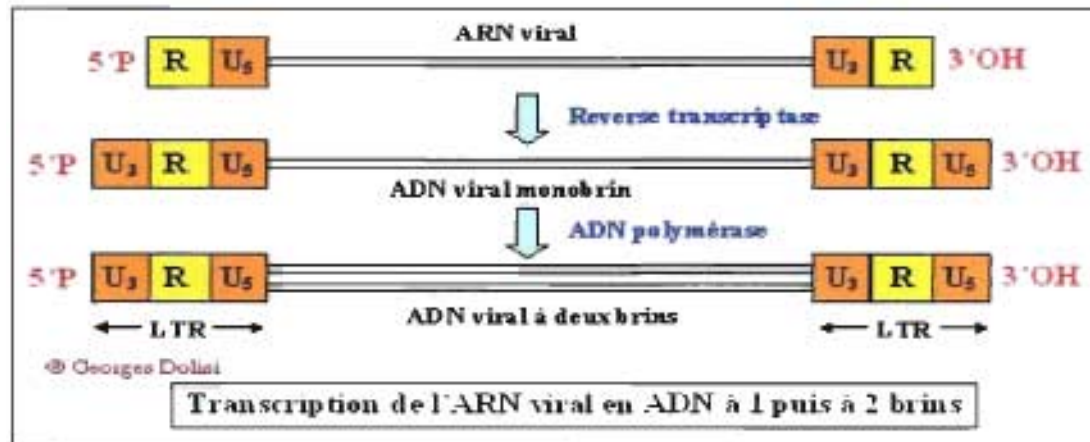


Figure 5 : Transcription de l'ARN viral

(4) Intégration

Cet ADN pénètre dans le noyau grâce à une endonucléase, puis sous l'action de l'intégrase, s'intègre au génome du lymphocyte afin d'y être opérationnel. Il est ensuite transcrit en ARN.

(5) Traduction

Après avoir été transcrits par l'ARN polymérase de la cellule, les ARN messagers viraux sont traduits en trois précurseurs protéiques. Ces précurseurs sont clivés par des protéases, pour donner les différentes protéines du virus.

(6) Assemblage

Les protéines virales et l'ARN viral (transcrit par ailleurs) sont associés pour reformer des virus en utilisant la machinerie enzymatique cellulaire. Les protéines virales membranaires sont intégrées à la membrane de la cellule infectée.

(7) Bourgeonnement

Le virus bourgeonne, emportant un fragment de la membrane plasmique du lymphocyte (qui contient uniquement les protéines membranaires virales).

1.3.3 Modes de transmission du VIH

Le virus est présent dans les liquides biologiques de l'organisme des personnes atteintes.

Les conditions de transmissions dépendent de plusieurs facteurs :

a) L'importance de la quantité du virus

Chez tous les individus, la quantité de virus joue un rôle important dans le processus de transmission. On retrouve principalement le virus dans le sang et les autres liquides biologiques tels que le sperme, le liquide séminal chez l'homme et dans les sécrétions vaginales, le lait maternel chez la femme. Le virus peut se transmettre par ces liquides. Cependant, une quantité et une concentration de virus importantes augmente davantage le risque de contamination.

b) Une porte d'entrée

Pour qu'il y ait contamination, le virus doit avoir accès à une porte d'entrée qui est soit la muqueuse lors de rapports sexuels non protégés (pénétration vaginale ou anale sans préservatif; rapports oraux génitaux), soit par la voie sanguine (utilisation d'une aiguille contaminée pour une injection par voie intraveineuse, transfusion sanguine), soit de la mère à l'enfant (transmission materno-fœtale, transmission pendant la grossesse et l'accouchement).

1.4 Diversité génétique du VIH

Le VIH, comme les autres lentivirus, est caractérisé par sa grande variabilité génétique qui entraîne une forte diversité. Cette diversité s'observe autant dans une population donnée entre les sujets infectés qu'au niveau de chaque patient suite à diverses pressions de sélection. Plusieurs facteurs agissant de façon concomitante ou non permettent d'expliquer ce phénomène.

1.4.1 Cause de la diversité génétique du VIH-1 : la variabilité génétique du VIH

1.4.1.1 La faible fidélité de la Transcriptase inverse (TI)

La TI présente dans la nucléocapside du virion est une enzyme codée par le gène *pol*. Comme nous avons eu à le montrer dans un chapitre précédent, le fait qu'elle ne possède pas d'activité 3'-5' exonucléasique il n'y a pas de correction des erreurs d'appariement commis lors de la réplication virale. D'où apparition de diverses espèces génétiques du VIH.

1.4.1.2 Le cycle réplcatif

Cette variabilité du VIH est accentuée par la rapidité du cycle réplcatif « turn over » estimé à 10^9 à 10^{10} virions produits par jour chez un individu infecté induisant ainsi une variabilité intrinsèque au sein de la population virale chez celui-ci, on parlera alors de « quasi-espèces » (Cohen, 1995). Le taux de cette divergence est estimé de 1 à 5 %, et

ces quasi-espèces vont évoluer différemment selon les différents compartiments (Ball *et al.*, 1994; Becquart *et al.*, 2002; Nowak *et al.*, 2002; Zhu *et al.*, 1996).

1.4.1.3 La recombinaison génétique

L'évidence selon laquelle les VIH avaient la capacité de se recombiner a été révélée très tôt. En 1989, Clavel *et al.* ont montré qu'un provirus défectif contenant un codon stop pouvait être sauvé par recombinaison avec un autre virus défectif qui portait une mutation différente. Quelques années plus tard, ce phénomène a été aussi décrit lors de cocultures de VIH-1 portant différentes mutations de résistance. Il en a été de même chez le SIV (Kellam & Larder, 1995; Wooley *et al.*, 1997). La TI, au cours de la synthèse de l'ADN, a la capacité de sauter (« switch ») de l'une à l'autre des deux copies d'ARN présentes dans le virion et contribue ainsi à l'augmentation de la probabilité d'émergence de virus divergents (An & Telesnitsky, 2002). Le VIH se recombine une à trois fois par cycle viral (Boyer *et al.*, 1992; Maldarelli *et al.*, 2004; Nora *et al.*, 2007). Les points de recombinaison sont retrouvés sur tout le génome avec une plus grande fréquence pour le gène *env* (34,6 %) suivi de *gag* (24,7 %) et *pol* (19,7 %) (Charpentier *et al.*, 2006; McCutchan, 2006; Nora *et al.*, 2007).

1.4.1.4 La pression de sélection

Les facteurs environnementaux comme les thérapies antirétrovirales (HAART), et la pression du système immunitaire favorisent la sélection des souches virales qui peuvent non seulement survivre dans ces conditions mais aussi s'y répliquer. Ces virus sont caractérisés par des mutations permettant la synthèse de protéines fonctionnelles adaptées à ces situations. Ces pressions dites positives entraîneraient la sélection de variants viraux portant des mutations non synonymes (changement de l'acide aminé) qui pourraient avoir un effet immédiat bénéfique pour le virus. Ces mutations ont été décrites dans les trois principaux gènes *gag*, *pol* et *env*. Dans *env* en particulier, il a été mis en évidence une grande variabilité surtout au niveau de la région du génome codant pour la glycoprotéine gp120, au cours de l'histoire naturelle de l'infection. Ceci s'expliquerait par le fait que les protéines codées par ce gène sont moins sensibles aux substitutions d'acides aminées et cette variabilité est un mécanisme d'échappement du système immunitaire (McGrath *et al.*, 2001). Les antirétroviraux exercent une pression qui permet la sélection de souches résistantes portant des mutations dans les gènes *gag* (site de clivage), *pol* (TI et Prot) et *env* (gp41) (Metzner *et al.*, 2007).

1.4.2 La diversité génétique – Origine

Les VIH-1 et VIH-2 proviennent d'une transmission zoonotique par le chimpanzé (*Pan troglodytes*) (Gao *et al.*, 1992; 1999) et le mangabey cendré (*Cercocebus atys*) (Gao *et al.*, 1992), respectivement. D'après Huet *et al.* dans un article paru dans Nature en 1990, il est pratiquement impossible de distinguer certaines souches du VIH-2 des souches SIV que l'on a retrouvé chez des singes en Afrique de l'Ouest. L'épicentre de ces infections serait donc l'Afrique Centrale et l'Afrique occidentale, habitats naturels de ces sources. C'est une organisation identique au niveau des génomes de ces différentes souches qui a permis de faire ce rapprochement. Particulièrement pour le VIH-1, un modèle de transmission a été suggéré par Preston *et al.*, dans un article paru dans *Journal of Medical Primatology* en 2004 (voir figure ci-dessous). Dans ce modèle, où ils proposent trois scénarios de possible transmission de SIV à l'homme en passant par le SIVcpz, les auteurs suggèrent une possible transmission croisée qui fait du SIVcpz, un recombinant qui dériverait du SIV chez les différents singes.

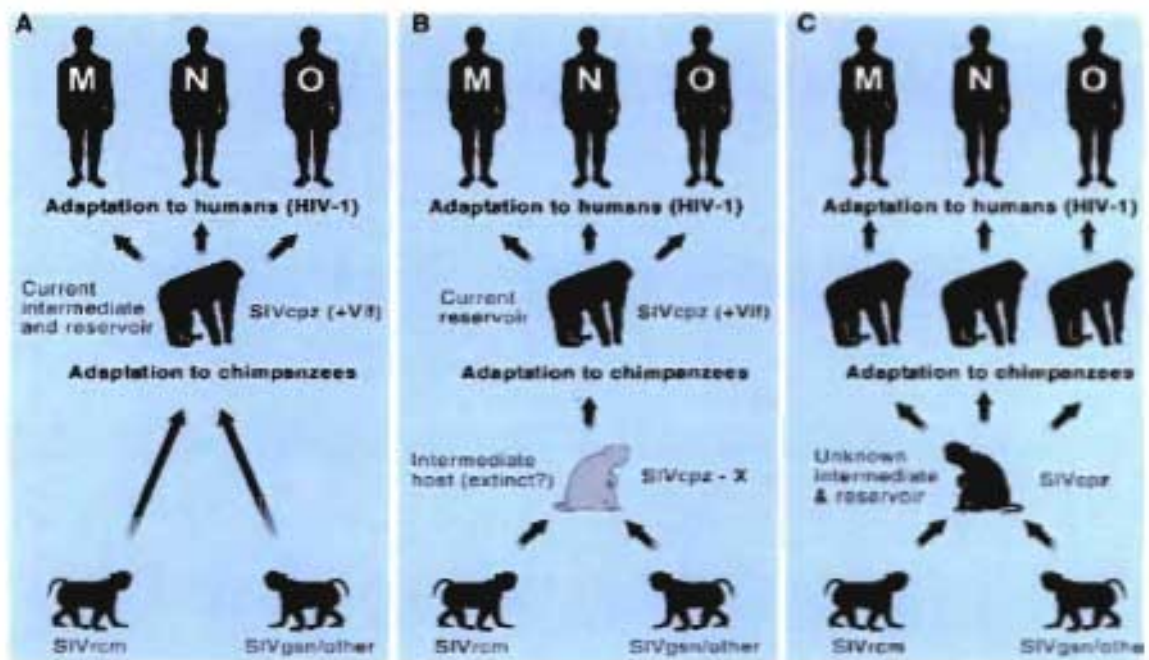


Figure 6 : Modèle de transmission du VIH (Preston A. *et al.* in journal of Medical primatology , 2004)

1.4.3 Classification des sous-types du VIH

1.4.3.1 Le VIH-1

Les analyses phylogénétiques de différents isolats de virus ont classé le VIH-1 en 3 groupes distincts M (« Main »), O (« Outlier ») (Charneau *et al.*, 1994; De Leys *et al.*, 1990) et N (Non-M, non-O ou « New ») (figure ci-dessous). Les deux derniers groupes sont rares et sont surtout retrouvés chez des patients en Afrique centrale.

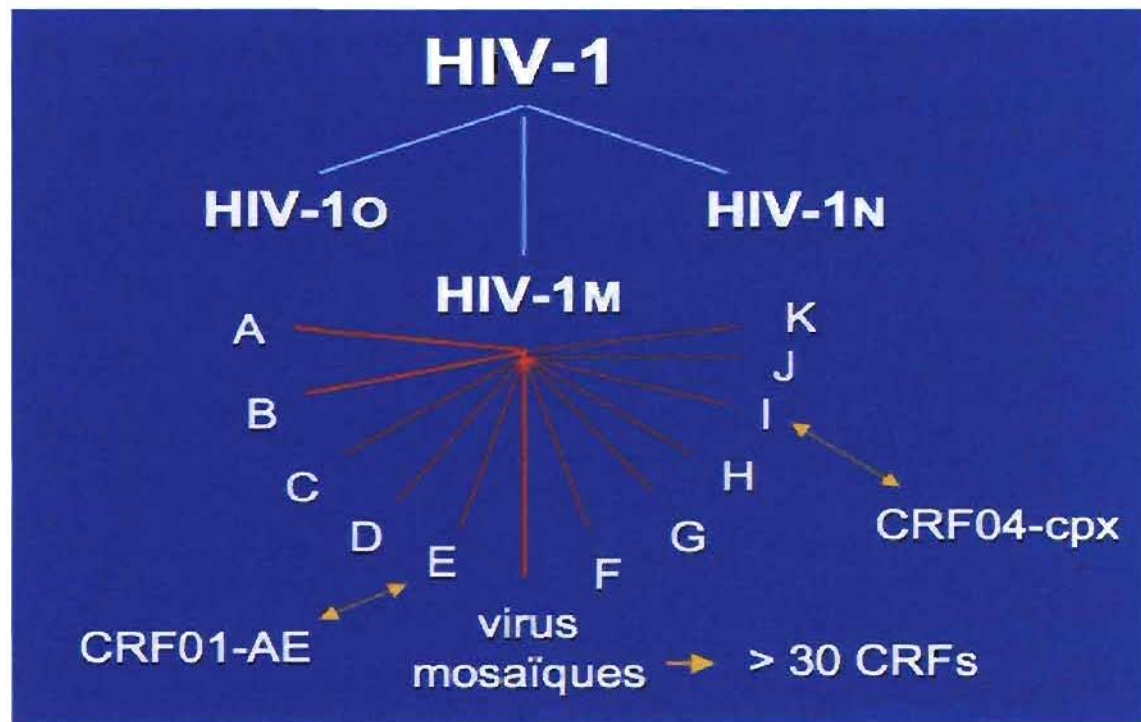


Figure 7 : Classification des sous-types du VIH- 1 (Charneau P. *et al.* in Virology 205 : 247-53, 1994).

La réalisation de longues PCR a permis de caractériser le génome entier des isolats de VIH (Salminen *et al.*, 1995). Afin d'identifier un sous-type, certaines conditions ont été définies. Les isolats doivent provenir d'au moins trois personnes non liées épidémiologiquement et qu'ils soient séquencés sur le génome entier. En outre un sous-type se devrait de rassembler des souches ayant plus de 80 % d'homologie génétique entre elles (Robertson *et al.*, 2000). Ces conditions ont donc permis de classifier et de nommer les sous-types. Ainsi, le groupe M est divisé en 9 sous-types (A, B, C, D, F, G, H, J, et K) (Robertson *et al.*, 2000). Ces isolats sont équidistants et homogènes. Cependant, une variabilité intra et inter sous-type ont été mise en évidence chez certaines souches. Par exemple, le sous-type F qui a été divisé en sous sous-types F1 et F2 et le sous-type A en A1 et A2 (Boucher, 1996). Il en est de même pour les sous-types B et D qui semblent appartenir au même sous-type, mais dont la nomenclature n'aurait pas changé pour des raisons historiques (Robertson *et al.*, 2000; Peeters & Sharp, 2000).

En plus de la variabilité inter sous-type, on a mis en évidence des variations chez des souches qui appartenaient à un sous-type différent selon la région du génome analysée (Robertson *et al.*, 1995; McCutchan *et al.*, 2006). Si certains de ces virus mosaïques restent restreints à quelques individus (URF), d'autres en revanche, baptisés CRF (circulating recombinant form) jouent un rôle important dans la pandémie du SIDA. Ces CRF constituent 10 à 20% des nouvelles souches caractérisées (Robertson *et al.*, 1995; Montavon *et al.*, 2000; McCutchan, 2006). Il existe actuellement 34 CRF dont les points de recombinaisons sur tout le génome et les sous-types impliqués ont été clairement définis (tableau en dessous).

| Nom | Profils | Origine |
|------------|-------------------|-----------|
| CRF01 AE | A, E | Thaïlande |
| CRF02 AG | A, G | Nigeria |
| CRF03 AB | A, B | Russie |
| CRF04 cpx | A, G, H, K, U | Grèce |
| CRF05 DF | D, F | Belgique |
| CRF06 cpx | A, G, J, K | Burkina |
| CRF07 BC | B', C | Chine |
| CRF08 BC | B', C | Chine |
| CRF09 cpx | CRF02, A, U | Ghana |
| CRF10 CD | C, D | Tanzanie |
| CRF11 cpx | A, CRF01, G, J | Grèce |
| CRF12 BF | B, F | Argentine |
| CRF13 cpx | A, CRF01, G, J, U | Cameroun |
| CRF14 BG | B, G | Espagne |
| CRF15 01B | CRF01, B | Thaïlande |
| CRF16 A2D | A2, D | Kenya |
| CRF17 BF | B, F | Burkina |
| CRF18 cpx | A1, F, G, H, K, U | Cuba |
| CRF19 cpx | A1, D, G | Cuba |
| CRF20 BG | B, G | Cuba |
| CRF21 A2D | A2, D | Kenya |
| CRF22 01A1 | CRF01, A1 | Cameroun |
| CRF23 BG | B, G | Cuba |
| CRF24 BG | B, G | Cuba |
| CRF25 cpx | A, G, U | |
| CRF26 AU | A, U | |
| CRF27 | Pending | |
| CRF28 BF | B, F | Brésil |
| CRF29 BF | B, F | Brésil |
| CRF30 0206 | CRF02, CRF06 | Niger |
| CRF31 BC | B, C | Brésil |
| CRF32 06A1 | CRF06, A1 | Estonie |
| CRF33 01B | CRF01, B | Malaisie |
| CRF34 01B | CRF01, B | |

Sources : <http://www.hiv.lanl.gov/content/hiv-db/CRF/CRF.html>

Tableau 1 : Classification des CRF du VIH-1 et leur origine

La répartition géographique des sous-types de VIH-1 est bien documentée (figure ci-dessous). Tous les sous-types et la majorité des CRF circulent en Afrique (Janssens *et al.*, 1997; Kanki *et al.*, 1997; Osmanov *et al.*, 2002), contrairement aux autres continents renforçant ainsi l'hypothèse de l'origine de la pandémie. En Afrique de l'Ouest, le CRF02_AG est prédominant, mais on note aussi la circulation de CRF06_cpx (Montavon *et al.* 2000, 2002; Peeters *et al.*, 2000). Sur le continent asiatique, les sous-types A, C et le CRF01_AE sont prédominants (Carr *et al.*, 1996; Lan *et al.*, 2003). En Europe de l'Ouest, en Amérique et en Australie, le sous-type B est majoritairement représenté. Le CRF03_AB a été isolé au cours de l'épidémie de SIDA chez les toxicomanes en Russie (Bobkov *et al.*, 1998; Liitsola *et al.*, 2000). Divers sous-types peuvent être présents dans la même région avec une prévalence plus ou moins élevée. Les facteurs épidémiologiques expliquant cette dynamique ne sont pas toujours clairement définis. Ainsi, en Thaïlande deux épidémies dues aux sous-types B et CRF01_AE ont été décrites respectivement chez les toxicomanes et les sujets infectés par voie hétérosexuelle (Kalish *et al.*, 1995; Wasi *et al.*, 1995). C'est aussi le cas en Russie avec les toxicomanes infectés par du CRF03_AB, ou en Afrique du Sud avec une infection des homosexuels par le sous-type B, dans une population essentiellement infectée par le sous-type C.

Globalement, le groupe M du VIH-1 est responsable de la pandémie avec comme principal effecteur le sous-type C représentant plus de 50 % des nouvelles infections (Kumar *et al.*, 2006). En outre, la circulation de ces différents variants favorise l'émergence de nouveaux recombinauts et a un impact sur la prévalence des sous-types non-B dans les pays développés (Fleury *et al.*, 2003; Holguin *et al.*, 2003; , Snoeck *et al.* 2002).

Le groupe O semble être endémique au Cameroun et dans les pays limitrophes avec une prévalence faible de 2 à 5 % (Loussert-Ajaka *et al.*, 1995; Peeters *et al.*, 1994.). Ces virus sont très divergents du groupe M avec lequel ils ne partagent que 50% d'homologie dans le gène *env* (Gurtler, 1994). Quant au groupe N, il fut décrit pour la première fois chez un patient camerounais en 1998 (Simon *et al.*, 1998). Sur le plan phylogénique, ces virus sont équidistants des groupes O et M. Selon la région du génome étudiée, la souche YBF-30 se regroupe avec le groupe M en 5', mais reste tout de même assez divergente de celle-ci, par contre dans le gène *env*, en 3', elle s'apparie avec des séquences de SIV_{cpz} (Simon *et al.*, 1998; Corbet *et al.*, 2000). L'émergence de ce groupe serait la conséquence d'une recombinaison entre rétrovirus humains et simiens confirmant les précédents concepts.

1.4.3.2 Le VIH-2

Plusieurs groupes nommés A, B, C, D, E, F, G ont été isolés au sein du VIH-2. (Gao *et al.*, 1994). La variabilité entre les différents groupes est similaire à celle du VIH-1 suggérant ainsi que cette infection est aussi ancienne que cette dernière (Zagury *et al.*, 1988). À ce jour, aucun virus isolé chez le « Sooty Mangabey » ne correspond aux différents sous-types décrits. Cependant, Chen *et al.* ont, en 1996, isolé des souches de SIV_{sm} de singes provenant d'Afrique de l'Est dont les séquences du gène *gag* formaient un regroupement (« cluster ») avec les sous-types D et E. Ces éléments supportent l'hypothèse que chaque groupe distinct de VIH-2 proviendrait de la transmission par différents singes (Peeters *et al.*, 1994).

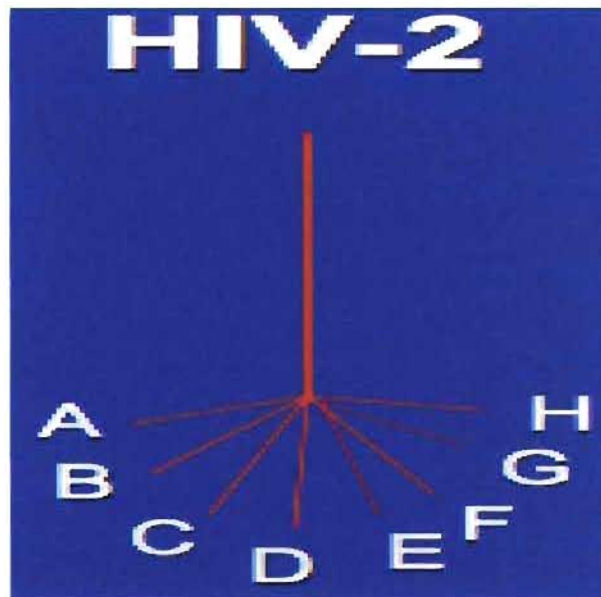


Figure 9 : Classification des sous-types du VIH-2 (Gao *et al.*, 1994)

1.5 Thérapeutique antirétrovirale et résistance aux antirétroviraux

1.5.1 Thérapeutique antirétrovirale

1.5.1.1 Principes et définition

L'infection à VIH est caractérisée par une réplication importante du virus dès son entrée dans l'organisme et l'établissement de réservoirs dès les phases précoces de l'infection. Cette infection chronique induit la destruction des lymphocytes T CD4+ aboutissant ainsi à une immunodépression. Sans intervention, cela aura un impact sur le processus vital du patient qui peut atteindre le stade de SIDA, puis la mort.

La zidovudine (AZT), un inhibiteur nucléosidique de la TI, fut le premier ARV développé. Son usage a vite montré les limites de la monothérapie avec l'apparition rapide de variants VIH résistants (Larder & Kemp, 1989; Nadembega *et al.*, 2006). D'autres molécules de la même classe furent découvertes plus tard et les premières associations thérapeutiques (bithérapies) plus puissantes furent proposées, donnant des résultats nettement plus encourageants (Nadembega *et al.*, 2006).

Cependant, la thérapeutique antirétrovirale n'a connu de véritable révolution qu'avec l'arrivée des inhibiteurs de protéase en 1996. Depuis lors, des associations thérapeutiques puissantes (trithérapies) ou HAART (highly active antiretroviral therapy) constituées initialement de deux inhibiteurs nucléosidiques et d'une antiprotéase, ont permis de réduire considérablement la mortalité et la morbidité liées à l'infection à VIH.

(Boucher, 1996; Race *et al.*, 1999; Rusconi *et al.*, 2000). D'autres associations en thérapie de première intention constituées de deux INTI et d'un INNTI ont été aussi recommandées afin de rendre la charge virale plasmatique indétectable. Les associations recommandées en première intention sont consignées dans le tableau ci-dessous.

| | | |
|--|---------------|--|
| Choix préférentiels | | |
| Association de 2IN +IP | | |
| AZT +dd AZT +3TC d4T +ddI d4T +3TC | l'une des 4 + | indinavir nelfinavir saquinavir- HCG/ritonavir ritonavir (1) |
| · Association de 2IN +1INN | | |
| AZT +ddI AZT +3TC d4T +ddI d4T +3TC | l'une des 4 + | éfavirenz névirapine (2) |
| · Association de 3IN AZT +3TC | l'une des 4 + | Abacavir (2) |
| Alternative: expérience plus limitée | | |
| 2IN +indinavir/ritonavir (faible dose) | | |
| 2IN +amprénavir/ritonavir (faible dose) | | |
| 2IN +lopinavir/ritonavir | | |
| Association non recommandée | | |
| 2IN | | |
| (1) Données récentes. (2) Manque de données. ABC : abacavir. (Source : ANRS AC11, groupe résistance, novembre 2000.) | | |

Source : http://www.sante.gouv.fr/htm/actu/rap_delf/5_ttarv.htm

Tableau 2 : Associations recommandées pour le traitement initial d'un patient VIH

1.5.1.2 Les inhibiteurs de la transcriptase inverse

a- Les inhibiteurs nucléosidiques et nucléotidiques (INTI)

Les analogues nucléosidiques sont des composés synthétiques proches des désoxynucléosides naturels (désoxyadénosine, désoxyguanosine, désoxythymidine, désoxycytidine) interrompant le cycle réplcatif du VIH en inhibant la transcriptase inverse. Ces analogues sont dépourvus de groupement hydroxyle en 3', empêchant la formation de liaisons phosphodiester au cours de l'élongation de la chaîne d'ADN. Ces « terminateurs de chaîne » doivent être triphosphorylés dans les cellules avant d'être actifs. Les voies de synthèse interdisent la prescription de certaines associations thérapeutiques (ex : zidovudine + stavudine). Ils entrent par la suite en compétition avec les analogues naturels, sont incorporés dans la chaîne en synthèse et arrêtent la synthèse de l'ADN viral (Montaner *et al.*, 2003). Les analogues nucléotidiques déjà monophosphorylés ne subissent pas la première étape de phosphorylation. Le seul représentant actuel est le ténofovir disoproxil fumarate (TDF). La toxicité mitochondriale due à l'inhibition de la polymérase gamma responsable de la synthèse de l'ADN mitochondriale est responsable des effets secondaires provoqués par ces molécules: acidoses lactiques, neuropathies périphériques, myopathies et lipodystrophies (Montaner *et al.*, 2003).

b- Les inhibiteurs non nucléosidiques (INNTI)

Les INNTI ont une structure chimique différente et un mécanisme d'action différent des INTI. Ils inhibent la TI de façon non compétitive en se fixant sur un site allostérique proche du site catalytique. Ils n'ont pas à subir de phosphorylation pour être actifs. Les INNTI ne sont actifs que sur les VIH-1 du groupe M, et inactifs sur le groupe O et le VIH-2 (Baird *et al.*, 2004).

La névirapine a été la première molécule de cette famille utilisée en thérapeutique. Elle est largement prescrite pour la prévention de la transmission du VIH de la mère à l'enfant dans les pays en développement en raison de son action puissante et de sa longue demi-vie (Connor *et al.*, 1994; Leroy *et al.*, 2002).

Cependant, l'acquisition de résistances, en général croisées aux trois molécules de cette famille (névirapine (NVP), efavirenz (EFV), delavirdine (DLV)), est rapide si la suppression de la réplication virale n'est pas effective. Ces mutations empêchent la fixation de ces molécules sur le site actif de l'enzyme. Les effets secondaires de ces drogues sont : des rashs cutanés (EFV, NVP), des atteintes du système nerveux central (EFV) et des hépatites (NVP) (Eshleman *et al.*, 2001; Weidle *et al.*, 2001; Shulman *et al.*, 2003).

1.5.1.3 Les inhibiteurs de la protéase (IP)

Les IP sont des peptidomimétiques qui vont épouser la forme du site actif de l'enzyme pour lequel ils ont une forte affinité et l'inhiber de façon irréversible. La majorité d'entre eux possède une séquence analogue au site phénylalanine-proline situé aux positions 167 et 168 de la polyprotéine Gag-Pol clivés par l'enzyme. Les particules virales produites en présence d'IP sont immatures car elles ne possèdent pas la structure du nucléoïde nécessaire aux phases précoces de la réplication. Elles sont incapables d'infecter d'autres cellules.

La majorité des IP sont métabolisés par la voie des cytochromes P450. L'utilisation de cette voie métabolique a pour conséquence des interactions médicamenteuses avec certains enzymatiques telles que la rifampicine prescrite pour le traitement de la tuberculose.

Le ritonavir (RTV), administré tout d'abord comme IP, est un inhibiteur du cytochrome P450 et est utilisé aujourd'hui à des doses non inhibitrices pour le virus, en tant que « booster » pharmacocinétique des autres IP. Les principaux effets secondaires induits par cette classe sont les troubles lipidiques et de la répartition des graisses (lipodystrophies).

1.5.1.4 Les inhibiteurs de fusion

L'enfuvirtide (ENF ou T20) est la première molécule approuvée dans cette nouvelle classe d'ARV. C'est un polypeptide synthétique de 36 acides aminés et dont le poids moléculaire est de 4492 daltons. La séquence des acides aminés correspond aux résidus 127 à 162 de la région HR2 (heptad repeat region) de la gp41 de la souche HIV-1 LAI, un isolat de sous-type B (Wild *et al.*, 1994). Ces polypeptides se fixent au domaine hélicoïdal HR1 près du domaine de fusion au niveau de l'acide aminé N terminal. Cette fixation empêche le changement conformationnel de la glycoprotéine gp41 en sa forme de fusion membranaire active, bloquant ainsi la pénétration du virus dans les cellules CD4+ (Kliger & Shai, 2000).

L'enfuvirtide est recommandé dans les associations thérapeutiques pour le traitement des patients en multi échec thérapeutique. Son inconvénient est qu'il s'administre en injections sous-cutanées biquotidiennes.

D'autres inhibiteurs d'entrée destinés à inhiber la fixation aux récepteurs CD4 ou aux co-récepteurs CCR5 et CXCR4 sont à l'étude. Les inhibiteurs du co-récepteur de CCR5 seront bientôt introduits dans la clinique et leur rôle dans l'arsenal thérapeutique est à déterminer.

L'intégrase, la TI et la protéase sont les trois principales enzymes nécessaires à la réplication du VIH. L'intégration de l'ADN viral dans le génome cellulaire est une étape très importante dans la réplication du VIH et constitue une cible potentielle. Des

molécules capables d'inhiber l'intégrase telles que la S-1360 et la L-870810 sont actuellement développées (Deprez *et al.*, 2004; Hazuda *et al.*, 2003). Dans cette même catégorie, à la suite d'un essai qui a été effectué sur des patients ayant des virus résistants à plusieurs classes de médicaments, le raltegravir (MK 0518) est désormais perçu comme un des meilleurs espoirs thérapeutique actuel pour ce genre de patients en traitement depuis longtemps et qui ne répondent plus aux classes de médicaments disponibles actuellement (Cahn & Sued, 2007; Grinsztejn *et al.*, 2007).

Le bevirimat, un inhibiteur de maturation qui empêche les virus produits, d'être infectieux en bloquant l'arrangement des protéines virales à l'intérieur du nouveau virion, reste aussi une alternative dans les nouveaux protocoles thérapeutiques (Temesgen & Feinberg, 2006).

D'autres cibles thérapeutiques telles que les inhibiteurs de l'activité ribonucléase H de la TI, les oligonucléotides antisens se fixant aux ARNm (sens), permettant ainsi leur dégradation par les RNases, sont aussi explorées.

1.5.2 Le traitement antirétroviral

1.5.2.1 Objectifs du traitement

Les multithérapies (HAART) ont radicalement modifié le pronostic de l'infection à VIH, notamment avec l'amélioration clinique et biologique des patients traités sous HAART. Les principes du traitement antirétroviral ont beaucoup évolué depuis la mise au point des premiers antirétroviraux. Les différentes classes de molécules, les contraintes liées aux interactions médicamenteuses, à l'observance, à l'intolérance, et à la chronicité de l'infection ne permettent pas de définir une stratégie globale, mais plutôt des algorithmes et une prescription individualisée. La disponibilité de marqueurs biologiques tels que la quantification de l'ARN VIH plasmatique et le dénombrement des lymphocytes T CD4 permettent d'évaluer, et de suivre l'évolution de l'état clinique des patients à l'instauration d'une thérapie antirétrovirale.

L'objectif du traitement est de réduire la mortalité et la morbidité par le contrôle de la réplication virale et la restauration du déficit immunitaire. Le moment idéal pour débiter la trithérapie n'a pas encore été déterminé mais il y a consensus pour traiter les sujets infectés par le VIH dont le taux de lymphocytes T CD4 est en dessous de 200 ou 350/mm³ (selon l'endroit où l'on se trouve). En effet, des études de cohortes ont démontré que la réponse au traitement à 32 semaines jugée sur une baisse de la charge virale plasmatique n'était pas différente selon que le taux de lymphocytes T CD4 était supérieur à 350/mm³, compris entre 200 et ou 350/mm³ inférieur à 200/mm³ à l'instauration du traitement (Phillips *et al.*, 2001). Une autre étude a mis en évidence que

si le taux de survie à 36 mois était indépendant du nombre de lymphocytes T CD4, le taux de survie était par contre amélioré si ce taux de lymphocytes T CD4 était supérieur à $200/\text{mm}^3$ (Hogg *et al.*, 2001). En 2003, Kaufmann *et al.*, dans la cohorte suisse, démontrent que des patients suivis depuis 4 ans qui ont un taux de lymphocytes T CD4 supérieur à $500/\text{mm}^3$ avaient une valeur initiale supérieure à $350/\text{mm}^3$ à l'initiation du traitement, l'âge et une mauvaise réponse virologique étant des facteurs affectant négativement la restauration immunitaire (Kaufmann *et al.*, 2003). Une étude sur 13 cohortes réalisées par Egger *et al.* en 2002, confirme que les traitements sont plus efficaces s'ils sont administrés avant que le taux de lymphocytes T CD4 n'atteigne $200/\text{mm}^3$. Cette même étude a démontré qu'une charge virale plasmatique supérieure à 100 000 cp/ml a une valeur pronostique péjorative indépendamment du taux de lymphocyte T CD4.

1.5.2.2 Stratégies de traitement

Plusieurs schémas ont été proposés par des groupes d'experts afin d'obtenir un effet antiviral puissant avec le minimum d'effets secondaires en tenant compte du risque de résistance et de résistance croisée en cas d'échappement virologique, de facteurs de risque cardiovasculaires, de l'observance, des perspectives de procréation, de la présence d'une co-infection par le virus de l'hépatite B ou C, des traitements (notamment antituberculeux) en cours. Les associations recommandées sont composées de deux INTI et un INNTI ou de deux INTI et un IP.

Le succès d'une thérapie antirétrovirale est associé à une charge virale faible lors de l'initiation du traitement, à un taux de lymphocytes T CD4 élevé au même moment, à une baisse rapide de la charge virale pendant le traitement et à une bonne observance. La prise en charge des patients infectés par le VIH est inscrite dans la prise en charge des infections chroniques.

Les limites de la thérapeutique antirétrovirale dues à la toxicité et à l'incapacité d'éradiquer le virus dans l'organisme ont orienté la recherche clinique vers différentes approches.

1.5.2.3 L'échec thérapeutique

Plusieurs situations d'échec au traitement sont observées :

- l'échec clinique caractérisé par la survenue de pathologies liées à l'histoire naturelle de l'infection au cours d'une HAART. Cette situation est souvent associée à une charge virale élevée et un effondrement des lymphocytes T CD4;
- l'échec immunologique, c'est l'absence d'élévation du taux de lymphocytes T CD4 au cours d'une HAART durant depuis au moins six mois. Ce cas s'observe souvent chez des patients ayant débuté une HAART avec un taux de lymphocyte T CD4 très bas et peut être associé à un échec virologique ou non;
- l'échec virologique résultant d'une inhibition sub-optimale de la réplication virale.

L'échec virologique, est admis en pratique courante lorsque la charge virale plasmatique ne devient pas indétectable après 6 mois de traitement ou lorsqu'elle redevient détectable à deux reprises après avoir été totalement supprimée.

Deux causes principales sont impliquées dans l'échec virologique :

- La présence de concentrations plasmatiques ou intracellulaires insuffisantes d'antirétroviraux, due à une mauvaise observance, à une posologie inadaptée, ou à une interaction médicamenteuse. C'est la cause majeure d'échec virologique lors d'un premier traitement (Descamps *et al.*, 2000; Masquelier *et al.*, 2002). Elle peut avoir pour conséquence la sélection des premières mutations de résistance.
- Le développement de la résistance aux ARV, qui sera considéré comme cause de l'échec essentiellement chez les patients multi traités. Il faut garder en tête qu'un sujet peut avoir été infecté par une souche comportant des mutations de résistance. Il s'agit de résistance primaire.

1.5.3 Résistance aux antirétroviraux

La résistance est un des facteurs majeurs impliqué dans l'échec thérapeutique. Elle est caractérisée génétiquement par l'apparition de mutations dans le génome du virus, permettant à celui-ci de se répliquer en présence de l'inhibiteur.

Deux concepts sont impliqués dans le développement de ces mutations de résistance :

- La rapidité du «turn over » et du nombre de virions produits qui est approximativement de 10^9 à 10^{10} particules virales par jour chez un sujet chroniquement infecté (Cohen 1995; Ho *et al.*, 1995).
- Le taux d'erreurs important commis par la TI lors de rétrotranscription, évalué à 10^4 , soit une erreur par génome recopié (Preston *et al.*, 1988).

Ces deux facteurs aboutissent à la production de variants portant des mutations apparaissant au hasard. La pression de sélection des molécules antirétrovirales va entraîner une sélection darwinienne du variant résistant du fait de l'avantage sélectif conféré. La rapidité de cette sélection dépend de la prévalence de ces variants dans la population virale, de l'avantage conféré par les mutations et de la concentration plasmatique des médicaments. Dans certains cas, une seule mutation suffit pour conférer une résistance de haut niveau à toute une classe d'antirétroviraux. Les mécanismes d'acquisition des mutations vont différer selon les classes thérapeutiques. Seule l'inhibition la plus complète possible de la réplication virale pourra empêcher l'émergence de nouveaux variants.

La relation entre une mutation et la résistance aux ARV peut être établie selon un ou plusieurs critères :

- (i) les tests phénotypiques après une mutagenèse dirigée;
- (ii) la corrélation phénotype/génotype chez des souches de laboratoire ou des isolats cliniques;
- (iii) le séquençage des isolats de patients en échec thérapeutique;
- (iv) la corrélation entre le génotype à l'initiation d'une molécule et la réponse virologique obtenue (Johnson *et al.*, 2003).

1.5.3.1 La résistance aux inhibiteurs de la TI

1.5.3.1.1 Les mutations de résistance aux INTI

Les mutations de résistance aux INTI sont situées majoritairement dans la région 5' codante de la polymérase. Elles sont soit sur le site actif de polymérisation (M184V/I) soit sur le site de fixation des nucléosides naturels (DNTP) (K65R, Q151M) ou à distance (T215Y/F). Selon les différents médicaments utilisés, on pourra définir les mutations de résistance comme suit :

- Zidovudine (AZT)

Six mutations du gène de la TI (M41L, D67N, K70R, L210W, T215Y/F, K219Q/E) peuvent entraîner une résistance à l'AZT (Boucher *et al.*, 1992; Yahia *et al.*, 2000). Ces mutations sont sélectionnées progressivement dans le temps et agissent par accumulation à l'exception des mutations au codon 215. La mutation T215Y à elle seule, peut réduire la sensibilité à l'AZT de la souche résistante de plus de 16 fois (Garcia-Lerma *et al.*, 2001). La mutation T215Y favoriserait la sélection de la mutation M41L, ce qui permettrait d'améliorer la capacité répliquative (fitness) de ces isolats (Kellam *et al.*, 1992). Deux substitutions d'acides nucléiques sont nécessaires pour obtenir les mutations T215Y/F.

Des mutations intermédiaires T215A/C/D/E/G/H/I/L/N/S/V dues à une seule substitution, peuvent être observées et correspondent à des mutations de réversion des mutations T215Y/F (Gallego *et al.*, 2003; Garcia-Lerma *et al.*, 2001). Ces profils ne

diminuent pas la capacité répliquative de ces souches qui restent sensibles aux ARV. En revanche, une seule mutation suffit pour qu'elles favorisent l'émergence de virus résistants en arborant les mutations T215Y/F dès l'introduction de drogues (De Ronde *et al.*, 2001). Des réversions sont observées à l'arrêt des inhibiteurs (Gallego *et al.*, 2003; Garcia-Lerma *et al.*, 2001).

- Stavudine (d4T)

Jusqu'aux années 2000, la seule mutation spécifique connue de la stavudine (d4T), était la mutation V75T (Lacey *et al.*, 1994). En 1999, Lin *et al.* décrivent des mutations rapportées à l'AZT chez des patients n'ayant jamais reçu cette molécule et traités par la d4T seule ou associée à d'autres molécules (Lin *et al.*, 1999). Ce phénomène est confirmé par d'autres auteurs (Pellegrin *et al.*, 1999; Ross *et al.*, 2001). Ces observations ont conduit à adopter la dénomination de TAM « thymidine analog mutations » pour les mutations M41L, D67N, K70R, L210W, T215Y/F, K219Q. Les virus évoluent habituellement selon deux voies de mutation des TAMs soit les TAMs 1 qui consistent en M41L, L 210W et T215Y ou les TAMs 2 qui consistent en D67N, K70R et K219Q et T215F. La sélection des TAMs varie selon les associations thérapeutiques incluant la d4T. En effet, la sélection des TAMs au cours de bithérapie d4T/3TC est rare alors qu'elle est fréquente lorsqu'il s'agit de d4T/ddI (36 %) (Mouroux *et al.*, 2001). Une faible diminution de la sensibilité au d4T lors des tests phénotypiques est observée chez des souches responsables d'échec thérapeutique (Calvez *et al.*, 2002).

- Lamivudine (3TC)

Seules les mutations au codon M184V/I situées au site actif de la TI sont associées à une résistance de haut niveau au 3TC. Ces mutations confèrent un haut niveau de résistance à la 3TC avec une CI_{50} qui peut augmenter de plus de 2 500 fois comparativement à la souche de référence (Wainberg *et al.*, 1996). Les mutations M184V/I, situées dans le site actif de la TI, affectent son bon fonctionnement et la rendent plus fidèle (Naeger *et al.*, 2001; Wainberg *et al.*, 1996). Elles favorisent la resensibilisation des isolats résistants à l'AZT en réduisant l'excision des terminateurs de chaînes (Boyer *et al.*, 2002). Une réversion est observée à l'arrêt de la molécule. Les mutations E44D/A et V118I peuvent être sélectionnées par le 3TC en l'absence de M184V (Delaugerre *et al.*, 2001; Hertogs *et al.*, 2000). Elles sont accompagnées de mutations de résistance à l'AZT (M41L, T215Y) et confèrent un bas niveau de résistance au 3TC ($CI_{50} \times 50$).

- Didanosine (ddI)

Très tôt, la mutation L74V a été associée à la didanosine (ddI) (St Clair *et al.*, 1991). Cette mutation entraîne une résistance croisée à la zalcitabine (ddC), une molécule retirée des prescriptions courantes. Les TAMs sont fréquemment observées dans des bithérapies associant le d4T (Mouroux *et al.*, 2001). Ces TAMs sont impliqués dans la résistance au ddI (Demeter *et al.*, 1995).

- Abacavir (ABC)

La résistance à l'abacavir (ABC) est associée aux mutations K65R, L74V, Y115F et M184V/I (Walter *et al.*, 2002). Une accumulation de TAMs favorise aussi une baisse de la sensibilité.

- Ténofovir disoproxil fumarate (TDF)

Le TDF est un analogue nucléotidique actif sur les isolats résistants à l'AZT, le ddI, le 3TC, l'ABC et portant la mutation Q151M (Winston *et al.*, 2002). Le TDF sélectionne une mutation de résistance K65R chez 2 à 3 % des patients (Margot *et al.*, 2002; Wainberg *et al.*, 1999). Comme l'ABC, un score de mutations constitué de 4 TAM M41L, D67N, L210W, T215Y/F et de trois autres mutations aux INTI E44D, T69D/N/S, L74V est validé pour interpréter les génotypes de résistance au TDF (Masquelier *et al.*, 2004).

- Emtricitabine (FTC)

L'emtricitabine (FTC), un analogue nucléosidique qui a été autorisé en pratique courante en 2003, aurait les mêmes profils de résistance que le 3TC (M184V/I, K65R) (Bang *et al.*, 2003; Johnson *et al.*, 2003).

- Multi-résistance

Certaines mutations particulières conférant une résistance croisée à plusieurs ARV sont parfois sélectionnées au cours de la HAART. L'insertion de deux sérines en position 69 est responsable d'une résistance croisée à tous les INTI couramment utilisés (Larder *et al.*, 1999). Un nombre plus élevé d'insertions ainsi que des délétions entraînant une résistance croisée aux INTI ont été mis en évidence par Masquelier *et al.* en 2001. Un autre profil de résistance correspond à la mutation Q151M (souvent accompagnée d'autres mutations de résistance) qui entraîne une résistance croisée aux INTI sauf le TDF et le 3TC. Ces mutations sont en général sélectionnées après l'accumulation de résistance aux INTI (Masquelier *et al.*, 2001).

- Mutations de résistance dans la RNase H

Des mutations induisant une résistance aux terminateurs de chaîne ont récemment été décrites dans le domaine de la RNase H. Ainsi, la mutation D549N diminue la résistance à l'AZT et au d4T de 10 et 2,6 fois respectivement et la mutation H539N de 180 et 10 fois pour les mêmes molécules (Nikolenko *et al.*, 2004).

1.5.3.1.2 Les mutations de résistance aux inhibiteurs non nucléosidiques de la TI

L'efavirenz (EFV) et la névirapine (NVP) sont les deux INNTI utilisés en pratique clinique. Elles ont en commun des mutations de résistance dont une seule peut conduire à une résistance de haut niveau (Bachelier *et al.*, 2000). Ces mutations sont situées entre les codons 100-108 et 179-190. La K103N est la mutation signature de la résistance à l'efavirenz et confère la résistance croisée aux autres INNTI. Les mutations aux codons 181, 190, 188 sont associées à la résistance à la névirapine. Certaines mutations de polymorphisme (K103R, V179I) associées à des mutations de résistance aux analogues nucléotidiques aux positions 67, 210, 215 pourraient contribuer à une hypersensibilité ($CI_{50} < 0,4$) de certains isolats à l'efavirenz (Shulman *et al.*, 2003).

1.5.3.2 La résistance aux IP

1.5.3.2.1 Les mutations de résistance aux IP

Les mutations de résistance aux IP peuvent être classées en deux groupes, les mutations primaires et secondaires (Johnson *et al.*, 2003). Les mutations dites primaires ou majeures sont les premières sélectionnées en présence d'IP et diminuent significativement la sensibilité des souches aux drogues. Quant aux mutations secondaires ou mineures, elles apparaissent plus tard, et n'ont pas d'impact significatif sur la sensibilité aux ARV individuellement.

- Saquinavir (SQV)

L'échappement au saquinavir (SQV) est associé aux mutations G48V et L90M (Roberts, 1995). La mutation L90M est plus fréquemment associée à la résistance des isolats cliniques (Boucher, 1996).

- Nelfinavir (NFV)

La résistance primaire au nelfinavir (NFV) est la D30N, observée dans les deux tiers des cas, suggérant que c'est le principal mécanisme de résistance à cette molécule (Patick *et al.*, 1998). L'autre tiers sélectionne la mutation L90M. La mutation N88D/S est sélectionnée secondairement. L'acquisition des mutations telles que M46I, A71V entraîne une résistance croisée aux autres IP. Récemment, il a été mis en évidence la substitution I84A qui, comme la I84V est responsable de résistance de haut niveau (facteur de multiplication de la CI_{50} supérieur à 26) au NFV et à d'autres IP (Mo *et al.*, 2003).

- Amprénavir (APV)

Quant à l'amprénavir (APV), la mutation primaire décrite est la I50V, qui provoque une baisse de la sensibilité de deux à trois fois *in vitro* (Partaledis *et al.*, 1995). Cette résistance étant accentuée lorsqu'elle est associée aux mutations M46I et I47V. Lors de premières lignes de traitement, la résistance croisée avec les autres IP est peu fréquente (Race *et al.*, 1999).

- Ritonavir (RTV)

Lors d'une exposition au ritonavir (RTV), la première mutation sélectionnée est la V82A (Molla *et al.*, 1996). Cependant, cette mutation n'induit qu'une résistance de bas niveau ($CI_{50} \times 2$) (Mammano *et al.*, 2000). Une résistance certaine est acquise après accumulation de mutations aux codons 20, 24, 32, 36, 46, 54, 67, 73, 77 et 90.

- Indinavir (IDV)

Pour l'indinavir, le mécanisme d'acquisition des mutations de résistance correspond à l'émergence possible de différentes mutations primaires (M46I, V82A et L90M) associées à M46I ou V82A (Condra *et al.*, 1996). Dans l'ensemble, la résistance à l'indinavir serait corrélée à une accumulation de mutations (Mammano *et al.*, 2000).

- Lopinavir / Ritonavir (LPV/r)

L'inhibition par de petites doses de RTV du cytochrome P450, impliqué dans le métabolisme du LPV a permis de les associer (LPV/r) en pratique clinique (Masquelier *et al.*, 2002). Ceci permet d'augmenter la concentration plasmatique du LPV et de garder un effet sur les souches résistantes à d'autres IP. La résistance au LPV/r est associée à l'accumulation de mutations aux positions 10, 20, 24, 33, 46, 50, 53, 54, 63, 71, 82, 84, 90 (Kempf *et al.*, 2000). Un score supérieur à cinq mutations est nécessaire pour obtenir une résistance (Masquelier *et al.*, 2002). Toutefois, cliniquement, les individus qui échouent une première thérapie avec le lopinavir/r ne développent pas de mutations aux IP.

- Atazanavir (ATV)

L'atazanavir (ATV) semble avoir un profil de résistance différent. En effet, les mutations I50L et A71V sont les premières sélectionnées lorsqu'il est prescrit en première ligne thérapeutique (Colonno, 2002). La résistance à l'ATV peut aussi être médiée par une accumulation de mutations. Les codons incriminés sont 10, 20, 24, 33, 36, 46, 48, 54, 63, 71, 73, 82, 84, 90 (Colonno *et al.*, 2003). Ces mutations peuvent être responsables de résistance croisée avec les autres IP.

- Tipranavir (TPV) et TMC114

Le tipranavir (TPV) est le premier IP non peptidique (Rusconi *et al.*, 2000). Associé au RTV, le TPV est actif sur les souches multi résistantes aux IP (Yang *et al.*, 2003). La résistance n'est observée que si l'isolat porte plus de deux mutations de résistance croisées aux IP (UPAMs : universal PIs associated mutations) aux codons 33, 82, 84 et 90 (McCallister *et al.*, 2003). Les souches résistantes portent en outre de nombreuses mutations secondaires compensatrices afin d'améliorer leur « fitness » (Hall *et al.*, 2003). Enfin le darunavir (TMC114) est un nouvel IP non peptidique, qui, associé au RTV, s'est montré efficace chez des patients multi traités et dont les souches portaient parfois plus de 6 mutations (King *et al.*, 2003; De Meyer *et al.*, 2003).

1.5.3.3 La résistance aux IF

Les principales mutations de résistance à l'enfuvirtide (ENF ou T20) sont situées sur une dizaine d'acides aminés (36 à 45) de la région HR1 de la gp41, la zone de fixation de cette molécule (Wei *et al.*, 2002). Ces mutations peuvent émerger rapidement en monothérapie et entraîner des résistances de haut niveau, la baisse de la sensibilité pouvant atteindre un facteur de 100 (Kilby & Eron, 2003). Certaines mutations de HR1 sont associées à des mutations compensatrices dans HR2. En 2003, Xu *et al.* ont mis en évidence que les substitutions au codon 43 étaient associées dans un tiers des cas à la mutation S138A. La région HR1 est accessible au T20 après la reconnaissance et la fixation au récepteur CD4 par l'enveloppe virale. Les corécepteurs (CCR5 ou CXCR4), jouant un rôle important dans cette conformation, peuvent influencer ce mécanisme. Ainsi une faible expression de ces récepteurs à la surface cellulaire ou une diminution de l'affinité du virus soit par le tropisme mis en jeu ou par l'existence de mutations dans la gp120 favorise l'exposition au T20 pour obtenir un effet antiviral optimal (Derdeyn *et al.*, 2001; Holguin *et al.*, 2007; Ray *et al.*, 2007; Reeves *et al.*, 2002). À l'arrêt du traitement, une réversion au phénotype sauvage est observée, étayant ainsi l'hypothèse du désavantage conféré par ces mutations sur le « fitness » du virus (Miralles *et al.*, 2004; Ray *et al.*, 2007).

1.5.4 Impact de la variabilité génétique sur la résistance aux ARV

1.5.4.1 Sensibilité naturelle des isolats de VIH-1 de sous-type non-B et du VIH-2

1.5.4.1.1 Sensibilité naturelle des sous-types VIH-1 non-B

Les mutations responsables de la résistance aux antirétroviraux sont bien caractérisées pour les souches du sous-type B circulant dans les pays développés. Par contre, les profils de mutations de résistance des sous-types non-B majoritaires dans les pays en développement, qui commencent à avoir accès aux ARV, sont différents sur certains points.

Les sous-types du groupe M et les différents CRF sont divergents de 10 à 15 % au niveau du gène *pol*, incluant les régions codant pour la TI et la protéase (Kantor & Katzenstein, 2003). Cette diversité génétique inclut le polymorphisme des codons impliqués dans la résistance aux ARV du sous-type B. Ces mutations de résistance sont décrites chez des patients naïfs de tout traitement ARV, infectés par différents sous-types non-B. Palmer et son équipe ont, en 1998, montré que la sensibilité *in vitro* des isolats de sous-type D était atténuée par rapport au sous-type B en présence de ZDV, 3TC, NVP, ddI et de RTV. Le séquençage des gènes codant pour la RT et la protéase de souches non-B (A, C, D, F1, F2, G, J, K, CRF01_AE, CRF02_AG) par Vergne *et al.* en 2000, confirme l'existence de mutations de résistance mineures aux IP chez ces sous-types. Toujours au niveau de la protéase, le sous-type G portant naturellement la mutation V82I présente un profil de résistance au SQV, RTV et IDV (Descamps *et al.*,

1998). Certaines mutations de polymorphisme sur des codons qui ne sont pas décrits dans des algorithmes d'interprétation de résistance peuvent avoir un effet sur la sensibilité des sous-types non-B. Ainsi, la mutation L89M de la protéase considérée comme une signature de certains sous-types (notamment le CRF02_AG) serait responsable d'une résistance aux IP (Calazans *et al.*, 2004).

En ce qui concerne le VIH-1 du groupe O, les substitutions A98G, Y181C et V106I, conférant une résistance aux INNTI, ont été décrites chez des patients naïfs de tout traitement, alléguant ainsi une résistance naturelle à cette classe d'antirétroviraux. (Quinones-Mateu *et al.*, 1998; Vergne *et al.*, 2000).

En 2004, un isolat de sous-type D isolé chez un patient naïf et portant les mutations I135L, T139V et V245T sur la TI était naturellement résistant aux INNTI (NVP, EFV) (Baird *et al.*, 2004).

Les isolats de sous-type C ont préférentiellement tendance à sélectionner la mutation K65R (Brenner *et al.*, 2006).

1.5.4.1.2 Sensibilité naturelle du VIH-2

La résistance naturelle du VIH-2 aux antirétroviraux s'explique différemment selon la classe des molécules. Le polymorphisme naturel aux codons impliqués dans la résistance permettrait d'expliquer la résistance à certains IP. En effet, en 2004, Colson *et al.* ont décrit des mutations de résistance naturelles aux IP, notamment aux codons 46 et 90. L'amprénavir, l'atazanir et le nelfinavir sont les IP pour lesquels le VIH-2 présenterait une résistance intrinsèque (Parkin & Schapiro, 2004).

Le VIH-2 présente une résistance naturelle à tous les INNTI avec une augmentation de la réplication parfois 100 fois supérieure à celle d'une souche sauvage du VIH-1 qui ne comporterait aucune mutation de résistance (Parkin & Schapiro, 2004).

En outre, les mutations de résistance aux INNTI aux codons 98A, 106I, 181I et 190A préexistent dans la TI de la souche sauvage (Rodes *et al.*, 2000). Quant aux INTI, le VIH-2 restait sensible à la majorité d'entre eux jusqu'à ce que des études récentes mettent en évidence une résistance in vitro du VIH-2 à l'AZT (Reid *et al.*, 2005).

1.5.4.2 Développement des mutations de résistance chez les isolats VIH-1 non-B et VIH-2

1.5.4.2.1 Développement des mutations de résistance chez les isolats non-B

Malgré l'importance du polymorphisme observé sur les gènes de la TI et de la protéase des sous-types de VIH-1 Non-B, les mutations de résistance responsables d'échec thérapeutique sont souvent les mêmes que celles observées chez le sous-types B. Adjé-Touré *et al.*, en 2001, ont démontré que dans une population majoritairement infectée par le recombinant CRF02_AG, les profils de résistance de ces souches isolées chez des patients sous HAART étaient semblables à celles des sous-types B. D'autres études confirment cette observation chez des patients sous HAART infectés par les sous-types A, C et D en Ouganda et au Zimbabwe (Kantor *et al.*, 2002; Weidle *et al.*, 2001). Cependant, la variabilité génétique a un impact sur les voies génétiques de sélection de certaines mutations. Ainsi, certaines mutations spécifiques de sous-type sont sélectionnées lors de thérapies antirétrovirales.

Pour le sous-type C, une mutation V106M conférant un haut niveau de résistance (facteur de 100 à 1 000) à tous les INNTI est sélectionnée après une exposition à l'EFV (Grossman *et al.*, 2004). D'autres mutations sont décrites aux codons 53, 123 et, 174 de la TI (Kantor *et al.*, 2002). La mutation D30N est le plus souvent sélectionnée lors de l'échec sous NFV avec les variants de sous-type B alors qu'on observe la sélection des mutations N88S et L90M chez les sous-types non-B (C, F, G et CRF01_AE) (Kantor *et al.*, 2002).

Dans des cohortes thérapeutiques, des profils particuliers aux sous-types non-B ont été décrits. Ainsi, dans une cohorte prospective de patients naïfs qui initiaient une HAART comprenant un IP, l'échec thérapeutique était fortement corrélé à la présence de mutations secondaires aux codons 10 et 36 de la protéase, mutations présentes à des fréquences élevées chez les sous-types Non-B (Perno *et al.*, 2001). Dans une étude comparative de la prévalence des mutations de résistance entre les virus de sous-types B et de sous-types non-B isolés chez des patients traités par des ARV, Montes *et al.* ont, en 2004, décrit une prévalence plus faible des mutations M41L, L210W et T215Y sur la TI du second groupe par rapport au premier. L'interprétation génotypique de l'ensemble des mutations retrouvées dans cette étude a montré que les souches de sous-types non-B étaient fréquemment moins sensibles aux INNTI contrairement à la ZDV, au d4T et au TDF. Une étude rétrospective a permis de déterminer les profils de mutations de résistance de patients infectés par le sous-type B ou le CRF01_AE (Ariyoshi *et al.*, 2003). Ces patients avaient reçu les mêmes lignes thérapeutiques. Cette étude a mis en évidence que chez les isolats résistants appartenant au recombinant CRF01_AE, les mutations L10F, K20I, L33I et N88S de la protéase, étaient plus fréquentes chez ces souches que chez le sous-type B et que les autres mutations de résistance observées n'étaient pas différentes de celles décrites pour le sous-type B. Des profils différents de sélection des mutations sont aussi observés chez les patients traités au Brésil et infectés par les sous-types B, F et C (Soares *et al.*, 2003). Sur le gène de la protéase, la mutation V82/A/F/T/S était fréquemment associée au sous-type F1 et sur la TI les mutations M41L et L210W étaient retrouvées sur le sous-type B.

Lors de la prévention de la transmission du VIH de la mère à l'enfant par une dose unique de névirapine, une étude en Ouganda a mis en évidence une proportion plus élevée d'émergence de résistance à cette molécule chez les virus des patientes infectées par un sous-type D en comparaison à celles infectées par un sous-type A (Eshleman *et al.*, 2001).

Si la mise en route de HAART dans les pays en développement, où circulent en majorité les sous-types non-B de VIH-1, associée à un suivi clinique adéquat donne de bons résultats (Laurent *et al.*, 2004), il ne faut pas négliger le fait que l'existence de polymorphismes liés au sous-type pourrait rendre certaines associations thérapeutiques moins efficaces (Vergne *et al.*, 2002; 2003). Pour optimiser les interprétations des tests de résistance de ces isolats, des algorithmes spécifiques doivent être définis.

1.5.4.2.2 Développement de la résistance pour le VIH-2

Lors de HAART, les mutations de résistance apparaissent sur les codons déjà décrits pour le VIH-1. Concernant la protéase, les mutations induisant une résistance primaire aux IP (IDV, RTV, NFV, SQV) situées aux codons 82, 84 et 90 sont retrouvées (van der Ende *et al.*, 2003). Sur le gène de la TI, les substitutions aux codons 65, 69, 70, 184 et 151 sont observées. La mutation M184V, toujours induite par une exposition au 3TC, et la mutation Q151M, responsable d'une résistance croisée aux INTI, se retrouvent fréquemment associées à un échec thérapeutique (Adjé-Touré *et al.*, 2003; van der Ende *et al.*, 2003). Le nombre limité de molécules efficaces pour le traitement de personnes infectées par le VIH-2 est un problème majeur. Le choix judicieux des premières lignes thérapeutiques paraît donc essentiel pour espérer une thérapie efficace contre le VIH-2.

1.5.4.3 La résistance primaire aux antirétroviraux

L'AZT a été le premier ARV mis en circulation. Par conséquent, les premiers cas de transmission de souches résistantes ont été décrits pour cette molécule (Masquelier *et al.*, 1993). Ce phénomène concerne depuis les trois classes d'ARV couramment prescrits (Colson *et al.*, 2002). L'existence de programmes de prévention de la transmission de la mère à l'enfant (PTME) est un autre facteur susceptible de favoriser l'émergence de la résistance. Ces PTME utilisent l'AZT, la NVP ou la 3TC dans des schémas thérapeutiques de courte durée (Ekpini *et al.*, 2002; Eshleman *et al.*, 2001; Leroy *et al.*, 2002). La NVP en dose unique *intrapartum* et aux nouveau-nés a été très prescrite. Dans des pays comme la Côte d'Ivoire, ces programmes PTME ont été mis en place bien avant le programme des Nations Unies et ce avec l'aide du gouvernement américains et l'ANRS en France (Ekpini *et al.*, 2002; Leroy *et al.*, 2002). Aucune mutation de résistance à l'AZT n'a été retrouvée chez les mères après six semaines de traitement à l'AZT dans un essai d'efficacité de cette molécule chez des femmes enceintes suivies à Abidjan entre 1996 et 1998 (Ekpini *et al.*, 2002). Dans l'essai PACTG 076 qui a montré aux USA et en France l'efficacité de l'AZT pour la PTME du VIH-1, 2,6 % des mères développaient une résistance (Connor *et al.*, 1994). Les doses uniques de NVP sélectionnent à des fréquences plus élevées des mutations de résistances chez les femmes ayant une suppression incomplète de la réplication virale (Duran *et al.*, 2007; Eshleman *et al.*, 2001; Nolan *et al.*, 2002). Des mutations telles que Y181C et K103N étaient les plus décrites et ont pu être archivées (Servais *et al.*, 2004), expliquant ainsi la diffusion secondaire des isolats résistants aux INNTI dans l'ensemble de la population infectée (Duran *et al.*, 2007).

Dans les pays développés qui ont une population de patients infectés majoritairement traitée par des ARV, la prévalence est estimée entre 10 et 20% lors des séroconversions (Chaix *et al.*, 2003; Little *et al.*, 2002). Chez les patients naïfs, à distance de la primo-infection, cette prévalence est plus faible et varie de 1 à 8% (Zaidi *et al.*, 2001). La transmission de ces souches pourrait varier selon le groupe à risque, le lieu et la période. Certains facteurs de transmission ont pu être définis. Chez des hommes homosexuels, ce risque serait lié au nombre élevé de personnes traitées et à la prévalence élevée des mutations de résistance dans cette population (Blower *et al.*, 2001).

La résistance primaire aux ARV a deux conséquences potentielles. La première est le risque de compromettre les chances de succès thérapeutique chez les patients infectés par des souches résistantes. En effet, lors d'une première ligne de traitement, la charge virale devient indétectable chez ces derniers dans un délai plus long (Grant *et al.*, 2002; Colson *et al.*, 2002; Little *et al.*, 2002). La seconde est une baisse du « fitness » des isolats résistants qui pourrait expliquer le décompte élevé de lymphocytes T CD4 observé chez certains sujets infectés par ces souches (Colson *et al.*, 2002).

2- RÉSULTATS

Characterization of drug resistance in a cohort of subjects on antiretroviral therapy infected with HIV-1 CRF02_AG and AGK subtypes in Mali and Burkina Faso

Mohamed Sylla¹, Annie Chamberland^{1,3}, Catherine Boileau², H A Traoré⁵, S Ag-Aboubacrine⁵, M Cissé⁶, S Koala⁷, J Drabo⁸, I Diallo⁸, A Traoré⁸, P Niamba⁸, Daniel Tremblay-Sher¹, Nimâ Machouf^{2,4}, Sélim Rashed¹, David Nickle⁹, Vinh-Kim Nguyen¹, MD Cécile L Tremblay^{1,3*} **for the ATARAO Group**

**Characterization of drug resistance in a cohort of subjects on antiretroviral
therapy infected with HIV-1 CRF02_AG
and AGK subtypes in Mali and Burkina Faso**

Mohamed Sylla¹, Annie Chamberland^{1,3}, Catherine Boileau², H A Traoré⁵, S Ag-
Aboubacrine⁵, M Cissé⁶, S Koala⁷, J Drabo⁸, I Diallo⁸, A Traoré⁸, P Niamba⁸, Daniel
Tremblay-Sher¹, Nimâ Machouf^{2,4}, Sélim Rashed¹, David Nickle⁹, Vinh-Kim Nguyen¹,
MD Cécile L Tremblay^{1,3*} **for the ATARAO Group¹**

RUNNING HEAD: Drug Resistance in HIV-1 non-subtype B

¹Département de Microbiologie et Immunologie, Université de Montréal, Montréal,
Canada, ²Département de Médecine sociale et préventive, Université de Montréal,
Montréal, Canada, ³Centre Hospitalier de l'Université de Montréal, Montréal,
Canada, ⁴Clinique l'Actuel, Montréal, Canada, ⁵Hôpital national du Point-G,
Bamako, Mali, ⁶CÉSAC, Bamako, Mali, ⁷Centre Oasis/AAS, Ouagadougou,
Burkina Faso, ⁸Centre hospitalier national Yalgado Ouédraogo, Ouagadougou,
Burkina Faso, ⁹Department of Microbiology, University of Washington School of
Medicine, Seattle, Washington, United States of America

***Annie Chamberland and Mohammed Sylla contributed equally to this manuscript**

Corresponding author: Cécile Tremblay, M.D.

Centre Hospitalier de l'Université de Montréal, 3840 rue St-Urbain, [information retirée / information withdrawn]
Montréal (Qc) H2W 1T8, Canada, E-mail: [information retirée / information withdrawn], Telephone:
[information retirée / information withdrawn], [information retirée / information withdrawn]

Support : This work was supported by CIHR grant no 24141 and US Public Health Service Center grant P30 27757 to Dr. James I. Mullins for the support of D.C.N. This work was also supported by an unrestricted grant from Boehringer Ingelheim. C.T. and VKN are CIHR New Investigators.

Word count: Abstract: 247

Text: 1999

Abstract:

Background: In a multi-centered cohort of patients on antiretroviral therapy (ART) in Burkina Faso and Mali, we analyzed the prevalence of HIV drug resistance mutations in patients failing a modified–directly observed therapy (mDOT) protocol.

Methods: Subjects on ART > 6 months and with viral load (VL) >500 c/ml were enrolled in a mDOT protocol. Genotypic resistance testing was performed on pre and post mDOT plasma samples of patients who still had VL>500 c/ml after mDOT.

Results: 801 subjects from seven sites participated in the study. 113 patients (14.1%) had VL >500 c/ml. Most subjects were treated with zidovudine or stavudine, lamivudine and efavirenz or nevirapine. Genotypes were available for 46. The predominant HIV-1 subtypes were CRF02_AG in 26 (56.5%), and AGK/K/AK in 12 (26.1%) patients. The prevalence of drug resistance mutations by class were for NRTIs: 184I/V(82.6%), 215Y/F(32.6%), 219E/Q(19.6%), 70R(19.6%), 67N(21.7%), 41L(15.2%), 151M(2.2%); NNRTIs: 103N(50%), 181C/I(19.6%). There was a trend towards a higher proportion of mutations associated with the TAM2 pathway in patients with K subtype reverse transcriptases (RT) compared to CRF02_AG subtypes (41.7% versus 19.2%).

Conclusion: While CRF02_AG is the dominant clade in the Burkina Faso/Mali region, isolates with subtype K RT were frequent in our cohort. The trend towards a more common TAM2 pathway for mutations in subtype K reverse transcriptase needs to be further evaluated in a larger cohort of non-B HIV infected individuals.

Keywords: HIV subtypes, resistance mutations, thymidine-associated mutations, antiretrovirals

Introduction

A rapidly growing number of HIV-infected individuals in developing countries now have access to antiretroviral therapy. The WHO estimated that, as of March 2006, 1.3 million people were receiving ART in Africa in middle and low income countries, a figure that more than tripled over the past two years [1]. These numbers are likely to expand even more rapidly as large interventions such as the US Presidential Emergency Program for AIDS Relief (PEPFAR), UNAIDS, the Global Fund and other organizations ramp up operations. As antiretroviral drugs are more widely used in countries where non-B HIV-1 subtype infections are prevalent, it is important to assess the drug resistance mutation pathways emerging among various subtypes. Some data suggest that non-B isolates show a different pattern of resistance mutations than the B subtype [2-4]. Reports have suggested that mutation V106M confers resistance to non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTIs) in subtype C HIV [5]. Furthermore, the D30N mutation is not preferentially selected by HIV-1 subtype C in the development of resistance to nelfinavir [6]. Differential evolution of resistance patterns among subtypes has important implications for clinical management and drug development. Differences in mutational pathways by different clades could affect our choices of first- and second-line regimens. They could also shed light on the molecular mechanisms by which HIV acquires and maintains resistance to antiretroviral agents. However, few data exist on drug resistance mutation pathways in non-B subtypes. Here we describe a group of patients in Burkina Faso and Mali in West Africa. These patients harbored non-B subtypes with resistance to antiretrovirals (ARVs), and were studied in the context of an intervention to support

adherence to treatment. We report the specific subtypes and mutations found as well as treatment histories for the patients from whom they were derived.

Methods

Study Population and Design. 801 patients from Mali (398) and Burkina Faso (403) were enrolled in a study to assess adherence to antiretroviral therapy. Viral loads were measured in all 801 subjects who had received ARVs for more than six months and an interview was scheduled with subjects to measure adherence. We administered an adherence evaluation questionnaire to 655 patients. In 113 subjects whose viral load was above 500 c/ml, a one-month adherence intervention (modified directly observed therapy mDOT) was proposed. 77 patients agreed and completed the intervention. Viral load was measured one month after the intervention. Genotypic analysis of drug resistance mutations was performed before and within a month following completion of the adherence intervention.

Viral load: Viral load was measured with COBAS AMPLICOR HIV-1 MONITOR Test, version 1.5 (Roche Diagnostics, Branchburg, New Jersey, USA), according to the manufacturer's instructions.

Genotypic analysis: Plasma viral RNA was extracted using QIAamp viral mini Spin Kit (QIAGEN, Mississauga, Ontario, Canada) and concentrated three times, according to the manufacturer's instructions. cDNA synthesis was performed using SuperScript III One-Step RT-PCR System with Platinum Taq Polymerase (Invitrogen, California, USA) with primers covering Gag-Pol domains (Gag-1824F, T_m 65°C and Pol-4295R, t_m 63.5°C) using a 30min cycle at 50°C. Amplification conditions were as follows: An initial 2min cycle at 94°C for denaturation; 40 cycles with three steps (15s at 94°C, 30s at 58°C, 5min

at 68°C); a final extension cycle for 5min at 68°C. Samples with low viral load or difficult to amplify were submitted to nested PCR with primers (Gag-1824F and Pol-4002R or Pol-2137F and Pol-4295R) in order to obtain the expected band. PCR products were separated on a 1% agarose gel to confirm the presence of a 2020 bp band. They were purified using QIAprep Spin Miniprep Kit 50 (QIAGEN). Sequencing was performed at Génome Québec (McGill University and Genome Quebec Innovation Centre, Montreal, Quebec, Canada) using 6 primers covering *Pol*. All nucleotide sequences were submitted to GenBank and provided with accession numbers (DQ001615-DQ991673, EF010976-77, EF525643-EF525650, EF525652-EF525667 and EF588323-EF588326).

Data analysis: Sequences were analysed using Sequencer 4.5 from Gene Codes Corporation software, Ann Arbor, MI. Analysis of drug resistance mutations and subtype analysis were performed using the Stanford University HIV Resistance Database. Results were confirmed using the Los Alamos HIV blast tool (LANL). The comparison of drug mutations according to subtype was analyzed using a non-parametric statistical analysis, using Mann-Whitney test by SPSS 12.0 for Windows.

Phylogenetic analysis: Sequences were aligned using Clustal W version 1.83 (Thompson, 1994) followed by manual alignment editing using BioEdit version 7.0.4.1. Pairwise alignment parameters were set to the dynamic "slow-accurate" programming, using 10 as the gap opening penalty and 0.1 as the gap extension penalty. Multiple alignment parameters included a gap extension penalty equal to 0.2 [7]. Subtypes references

sequences were obtained from Los Alamos National Laboratory HIV sequence database (<http://www.hiv.lanl.gov/>). We estimated a maximum likelihood (ML) tree with our data (AG and AGK) and each available sequence from the LANL HIV database from the same subtypes and gene region (97 sequences). Phylogenetic analysis was done by first using PAUP* to estimate a starting NJ tree, and then used the swapping algorithm SPR under an HKY+G+I model of evolution.

Population Substructure:

We used two methods to determine whether our study population was distinct from the previously described AG and AGK clades. First, we used a cladistic based method [8, 9] to determine if HIV sequences from within our study population had a history of migration between the local population and AG and AGK strains found elsewhere. If no migration of virus took place between these populations we would expect phylogenetic analysis to reveal a single common ancestor. We therefore estimated a maximum likelihood (ML) tree with our data (AG and AGK) and as many database sequences from the LANL HIV database of the same subtypes and gene region (97 sequences). We used PAUP* [10] to generate a NJ tree and then used the swapping algorithm SPR under an HKY+G+I model of evolution to estimate an ML tree. We then mapped the number of potential migration events between populations onto the phylogeny using parsimony in the software program MacClade [11]. Specifically, a two-state character was created such that sequences were assigned the same character state based on their geographic origin. We then measured the number of times there was a transition between states on the phylogeny. If the sequences in our study population were monophyletic, the maximum

number of character state changes (migrations) would be one. If, however, sequences from our study population were intermingled in the total phylogeny, the number of estimated migration events would increase. The result is the most parsimonious estimate of the minimum number of migration events between groups, predicated on the estimated ML phylogeny. Permuting the labels on the tree and re-measuring the minimum number of migration events was also done to determine the null estimate of free migration, and significance was determined by comparing our observed value to the null.

Next, we used a genetic distance based method called S_{nn} reported to be one of the most statistically powerful to detect a restriction of gene flow among populations [12] using genetic distance data. This method enumerates the number of individuals that are the closest in terms of genetic distance (e.g. nearest neighbor (nn)) to each individual sampled from both putative populations, and then simply sums the number of nn individuals within each populations divided by the total number of nn across all putative groups arriving at the S_{nn} test statistic. P values are determined nonparametrically by randomizing the genetic distance between individuals. S_{nn} would be large if there was no differentiation between groups and if each group appeared to be genetically distinct.

Results

To be eligible for antiretroviral therapy, most patients had to have CD4 counts ≤ 200 cells/mm³. Most patients were receiving a non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor (NNRTI) plus two nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NRTI) with stavudine, lamivudine and nevirapine being the most commonly used regimen. Of the 801 patients enrolled on therapy, viral load was measured in 798 patients. After six months of therapy, 598 (74.9%) had plasma HIV-1 RNA < 50 copies/ml. Adherence intervention, including counseling and home visits, was performed in patients (200) with detectable viral load at that time. 13 more patients achieved an undetectable viral load after this intervention, for a total of 611 (76.5%).

Resistance testing was performed before and after adherence intervention in subjects with plasma viral RNA loads above 500 c/ml. Some viral sequences could not be amplified because of the poor quality of the samples. We report findings on 46 patients for whom genotypes were obtained. Characteristics of these patients are summarized in Table 1. In both countries, the predominant form of virus was circulating recombinant form CRF02_AG, accounting for 56.5% of the patients tested, followed by CRF_AGK in 26.1%. These viruses were composed of AG subtype sequences in protease and K sequence in RT. One patient's virus was K subtype over both protease and RT and another patient's was AK. Other subtypes represented in single subject were: A, C, AGG (which differs from our other AGs only in protease domain with clade G), GH, BD and B; CRF01_AE was found in 2 subjects. Some previous reports indicated that CRF02_AG

is common in West Africa [13-15], whereas subtype K is rare [15]. Most of our AGK isolates were from Burkina Faso (8/10), which is consistent with recent reports describing CRF 06_cpx (a mosaic of A, G, J and K subtypes) and CRF 09_cpx in this country [16, 17]. There was no known epidemiological link among the patients as assessed by our demographic questionnaire and our phylogenetic analysis. However, the genetic distances between all AGK isolates were small. Our subtype K isolate, originating from Mali, clustered with the only two other subtype K isolates described in the literature (from Cameroon and Congo) as well as some CRF 09_cpx strains. Isolates from Mali and from Burkina Faso did not cluster preferentially within a country (Figure 3 and 4).

Resistance mutations found in the 46 patients are shown in Figure 1. The most common NRTI resistance mutation encountered was the 184I/V (82.6% of patients). 52.1% of patients had thymidine-associated mutations (TAMs). 21.7% had mutations characteristic of the TAM1 pathway (M41L, L210W, T215Y) and 30.4% of the TAM2 pathway (D67N, K70R, T215F, K219Q/E). Of interest, a higher proportion of mutations associated with the TAM2 pathway was observed in patients harboring viruses of the AGK or K subtypes compared to CRF02_AG subtypes (41.7% vs 19.2%, $p=0.150$), although this trend was not statistically significant perhaps due to the small sample size. One subject had the Q151M MDR mutation complex. Very little viral evolution occurred between the time-points. Only three subjects acquired additional NRTI mutations between the two time-points (Figure 2a).

Groups of thirteen subjects each were on NNRTI, nevirapine-containing or efavirenz-containing regimens. However, 36 had NNRTI resistance-associated mutations; K103N was the most common (50%), followed by Y181C (19.6%), G190A/S (17.4%), P225H (19.6%) and K101E (13%). The K103N mutation was more common in CRF02_AG infections as opposed to CRF AGK/K infections (69.2 vs 33.3%, $p=0.042$). However, more patients with CRF02_AG were on efavirenz-containing regimens (56% compared to 17% of CRF AGK/K subtypes). K103N mutations were present in 13 of 16 (81%) subjects on efavirenz-containing regimens (all of them are subtype AG), in contrast to 6 of 17 (35%) nevirapine-containing regimens (4 of 5 AG and 2 of 8 AGK on nevirapine-containing regimens). K101E was predominantly identified in CRF AGK/K subtypes (25% vs 0% in CRF02AG subtype) (Figure 2b).

11 subjects received a protease inhibitor containing regimen (indinavir). Four of them harbored protease inhibitor (PI) resistance associated (G48W, I54V, V82A/T). Several polymorphisms, such as K20I and M36I and L10V/M/I, were observed.

Drug Resistance Evolution:

We used two methods to ascertain the probability that the observed drug resistance patterns in the population we studied was driven by transmitted drug resistance virus or by independent evolution of the drug resistant genotypes. First, we used a nonparametric cladistic based approach to determine the level of independent evolution for each drug resistant mutation. We started with a maximum likelihood (ML) tree created while correcting for multiple evolutionary events at the same site using the HKY+G+I model of evolution. To avoid the compounding effect of convergent evolutionary changes at drug resistance sites we deleted these sites from the data used to estimate the ML tree. Next we mapped the drug resistance mutations on the estimated ML topology using parsimony criteria. We set out to test the hypothesis that the drug resistance mutations were being transmitted within the population and not derived independently. If this hypothesis were true we would expect mutations that change a codon from a drug sensitive variant to a drug resistant variant to be a rare event on the tree, with most of these changes occurring early, and thus found near the root of the phylogeny. In contrast, if this hypothesis was incorrect we would see many such changes near the tree tips of the phylogeny, and the number of evolutionary events on the tree required for the evolution of drug resistance would be high. To test this hypothesis we compared our observed number of drug sensitive genotypes evolving into drug resistant genotypes on the ML tree with the null of random independent evolution of drug resistance. In other words, this null hypothesis explicitly states that the evolution of drug resistance is random with respect to the tree.

If drug resistance mutations were being transmitted in the population we would expect our observation to be significantly outside the null distribution. To obtain the p-value we compared the observed number of drug resistance mutations evolving on the ML tree to our null hypothesis, which is the distribution of same evolutionary measure across 1000 independent random trees given the drug resistance mutations we observed.

The second method we used to determine if drug resistance was being transmitted among the individuals within our local study population was to derive ML estimates of the ancestral state of each independent cluster of viruses found in our study population. Specifically, we estimated the ML tree as stated above, and then determined the ML estimates of the sequence residing at every node of each cluster. We then evaluated each of those sequences *in silico* for drug resistant mutations.

We found that viruses in our study population are genetically distinct from previously described strains (Figure 3). First we found that the ML tree topology supports the notion that our population is more isolated than we expect by chance alone ($p < 0.001$). We observed 18 migration events between our AGK and AG variants and similar CRF found in the LANL database. We also found that the genetic distance data supported the same conclusion. The S_{nn} value we observed was 0.64 and the probability of observing a value this small or smaller under the null of free gene flow is $p = 0.013$.

Our cladistic-based method revealed that the number of times drug resistance evolved in our population appears to be no different than our random expectation. That is to say that

the evolution of drug resistant viruses from sensitive virus was similar to what we would expect if drug resistance mutations were evolving rather than being transmitted in the population. If the population of infected HIV individuals were transmitting drug resistant viruses to each other at appreciable frequencies we would see many fewer evolutionary events (i.e. evolution of drug sensitive variant to a drug resistant variant) on the phylogeny. The ancestral state would harbour drug resistance mutations and all of the descendants from the ancestor would also be drug resistant, thus requiring few changes on the phylogeny to adapt to this selective force. We observed 57 changes from drug sensitive to drug resistant genotypes in the AG dataset, which was no different than the random expectation ($p = 0.7$). In the AGK dataset we observed 17 changes from drug sensitive to drug resistant ($p = 0.058$). The marginal significance for the AGK set was perhaps due to the smaller sample size decreasing the statistical power. Ancestral states estimated on the ML tree were drug sensitive, further supporting the notion that antiretroviral drug resistance arrived in this population due to *de novo* mutations.

Discussion

This study is the largest to date on viruses encoding subtype K reverse transcriptase, and reports some intriguing findings. First, in our group experiencing virological failure, subjects with HIV AGK subtype were common. The epidemiological significance of this finding is difficult to ascertain given that the majority of the 801 patients sampled had undetectable viral loads and therefore their subtype could not be determined. The prevalence of CRF_AGK in the West African countries of Burkina Faso and Mali has not been extensively studied [13, 15, 18]. According to our phylogenetic analysis, it is unlikely that the high prevalence of AGK in our resistant patients was due to primary infection with a circulating resistant strain. Furthermore, the patterns of drug resistance mutations differed among subjects. While eight of the nine patients were cared for at the same site, they came from different neighborhoods and did not know each other with the exception of two patients who were married. Furthermore, our phylogenetic analysis illustrates that although the genetic distances among the isolates are small, there was no clustering of a particular subtype in a specific region.

In our population, subtype K reverse transcriptase isolates tended to evolve NRTI resistance predominantly through the TAM2 pathway in contrast to what was observed with our CRF02_AG strains and what is usually observed with subtype B strains [19, 20]. This suggests that there may be differences in the molecular evolution of resistance in this clade. In subtype B, TAM1s are more common than TAM2s, likely because of secular trends in sequential use of ARVs which have evolved over time or possibly due to a fitness advantage conferred by certain mutations such as T215Y or L210W in a TAM1

background [21]. In our cohort of patients, treatment regimens were similar among subtypes. Furthermore, none of the subjects who were on a d4T regimen developed any TAMs. Therefore, the differences observed in the pattern of TAMs could not be attributed to the treatment regimen. Further evidence supporting the hypothesis that AGK RT may differ in its molecular evolution toward resistance stems from the finding that NNRTI resistant AGK mutants were more likely to have Y181C than K103N, whereas the converse was true for CRF_AG02 mutants. However subjects with CRF02_AG had been more exposed to efavirenz-containing regimens.

Six subjects did not have any resistance mutations, although only one of them was reported to be non-adherent. At the second-time point, 20 of 46 subjects harboring resistance mutations had NNRTI as well as TAM and the 184V mutations, compromising their future therapeutic options. The other 20 subjects had more favorable patterns of mutations: 14 of 46 subjects had NNRTI + the 184V mutations; 2 only had the 184V mutation. 1 had NNRTI + TAM; 1 had the Q151M complex + NNRTI mutations; 1 had 69S + NNRTI mutations; 1 only had NNRTI resistance mutations.

This is the first analysis of the molecular evolution of a group of subtype K reverse transcriptases under antiretroviral selective pressure. Our data suggest that subtype K viruses may evolve differently from other subtypes after exposure to reverse transcriptase inhibitors. This may have important consequences on treatment options and second-line regimens as more drugs become available to individuals in resource-poor settings. These findings indicate that further molecular studies in AGK viruses are warranted.

Acknowledgements

We wish to acknowledge G. Bélanger-Jasmin for her laboratory support, the entire ATARAO team, and the patients from Mali and Burkina-Faso for participating in this study.

References

1. Kuehn BM. UNAIDS report: AIDS epidemic slowing, but huge challenges remain. *JAMA* 2006; **296**:29-30.
2. Ariyoshi K, Matsuda M, Miura H, Tateishi S, Yamada K & Sugiura W. Patterns of point mutations associated with antiretroviral drug treatment failure in CRF01_AE (subtype E) infection differ from subtype B infection. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2003; **33**:336-342.
3. Bussmann H, Wester CW, Masupu KV, Peter T, Gaolekwe SM, Kim S, Reich AM, Ahn S, Wu Y, Thior I, Essex M & Marlink R. Low CD4+ T-lymphocyte values in human immunodeficiency virus-negative adults in Botswana. *Clin Diagn Lab Immunol* 2004; **11**:930-935.
4. Calazans A, Brindeiro R, Brindeiro P, Verli H, Arruda MB, Gonzalez LM, Guimaraes JA, Diaz RS, Antunes OA & Tanuri A. Low accumulation of L90M in protease from subtype F HIV-1 with resistance to protease inhibitors is caused by the L89M polymorphism. *J Infect Dis* 2005; **191**:1961-1970.
5. Quan Y, Brenner BG, Marlink RG, Essex M, Kurimura T & Wainberg MA. Drug resistance profiles of recombinant reverse transcriptases from human immunodeficiency virus type 1 subtypes A/E, B, and C. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2003; **19**:743-753.
6. Grossman Z, Paxinos EE, Averbuch D, Maayan S, Parkin NT, Engelhard D, Lorber M, Istomin V, Shaked Y, Mendelson E, Ram D, Petropoulos CJ & Schapiro JM. Mutation D30N is not preferentially selected by human immunodeficiency virus type 1 subtype C in the development of resistance to nelfinavir. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; **48**:2159-2165.
7. Kumar M, Jain SK, Pasha ST, Chattopadhyaya D, Lal S & Rai A. Genomic diversity in the regulatory nef gene sequences in Indian isolates of HIV type 1: emergence of a distinct subclade and predicted implications. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2006; **22**:1206-1219.
8. Slatkin M & Maddison WP. A cladistic measure of gene flow inferred from the phylogenies of alleles. *Genetics* 1989; **123**:603-613.
9. Slatkin M & Maddison WP. Detecting isolation by distance using phylogenies of genes. *Genetics* 1990; **126**:249-260.
10. Swofford DL. PAUP* 4.0: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods). Edited by Editor|. Year|; p.^pp. Pages|. City|: Publisher|.

11. Maddison WP & Maddison DR. *MacClade - Analysis of Phylogeny and Character Evolution - Version 4*. 2001. Sunderland, MA: Sinauer Associates, Inc.
12. Hudson RR. A new statistic for detecting genetic differentiation. *Genetics* 2000; **155**:2011-2014.
13. Laurent C, Bourgeois A, Faye MA, Mougnotou R, Seydi M, Gueye M, Liegeois F, Kane CT, Butel C, Mbuagbaw J, Zekeng L, Mboup S, Mpoudi-Ngole E, Peeters M & Delaporte E. No difference in clinical progression between patients infected with the predominant human immunodeficiency virus type 1 circulating recombinant form (CRF) 02_AG strain and patients not infected with CRF02_AG, in Western and West-Central Africa: a four-year prospective multicenter study. *J Infect Dis* 2002; **186**:486-492.
14. Osmanov S, Pattou C, Walker N, Schwardlander B & Esparza J. Estimated global distribution and regional spread of HIV-1 genetic subtypes in the year 2000. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2002; **29**:184-190.
15. Triques K, Bourgeois A, Vidal N, Mpoudi-Ngole E, Mulanga-Kabeya C, Nzilambi N, Torimiro N, Saman E, Delaporte E & Peeters M. Near-full-length genome sequencing of divergent African HIV type 1 subtype F viruses leads to the identification of a new HIV type 1 subtype designated K. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2000; **16**:139-151.
16. Nadembega WM, Giannella S, Simporé J, Ceccherini-Silberstein F, Pietra V, Bertoli A, Pignatelli S, Bellocchi MC, Nikiema JB, Cappelli G, Bere A, Colizzi V, Perno CP & Musumeci S. Characterization of drug-resistance mutations in HIV-1 isolates from non-HAART and HAART treated patients in Burkina Faso. *J Med Virol* 2006; **78**:1385-1391.
17. Tebit DM, Ganame J, Sathiandee K, Nagabila Y, Coulibaly B & Krausslich HG. Diversity of HIV in rural Burkina Faso. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2006; **43**:144-152.
18. McCutchan FE, Carr JK, Bajani M, Sanders-Buell E, Harry TO, Stoeckli TC, Robbins KE, Gashau W, Nasidi A, Janssens W & Kalish ML. Subtype G and multiple forms of A/G intersubtype recombinant human immunodeficiency virus type 1 in Nigeria. *Virology* 1999; **254**:226-234.
19. Cozzi-Lepri A, Ruiz L, Loveday C, Phillips AN, Clotet B, Reiss P, Ledergerber B, Holkmann C, Staszewski S & Lundgren JD. Thymidine analogue mutation profiles: factors associated with acquiring specific profiles and their impact on the virological response to therapy. *Antivir Ther* 2005; **10**:791-802.

20. Kuritzkes DR, Bassett RL, Hazelwood JD, Barrett H, Rhodes RA, Young RK & Johnson VA. Rate of thymidine analogue resistance mutation accumulation with zidovudine- or stavudine-based regimens. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2004; **36**:600-603.
21. Hu Z, Giguel F, Hatano H, Reid P, Lu J & Kuritzkes DR. Fitness comparison of thymidine analog resistance pathways in human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol* 2006; **80**:7020-7027.

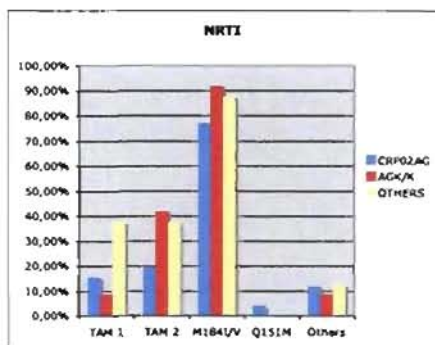
Table 1: Patients' characteristics

| | CRF02_AG | CRF_AGK/K | Others | TOTAL |
|--|-----------|-----------|----------|----------|
| Female N(%) | 11 (44) | 10 (40) | 4 (16) | 25 |
| Male N(%) | 12 (57.1) | 4 (19.04) | 5(23.8) | 21 |
| Subtype Distribution (%) | 26 (56.5) | 12 (26.1) | 8 (17.4) | 46 (100) |
| Mean CD4 (cells/mm³) | 161 | 210 | 197 | 189 |
| Drug Regimen * | | | | |
| ZDV + 3TC + NVP | 5 (19.2) | 5 (41.6) | 2 (25) | 12 |
| ZDV + 3TC + EFV | 13 (50) | 1 (8.3) | 0 | 14 |
| D4T + 3TC + NVP | 0 | 3 (25) | 1 (12.5) | 4 |
| D4T + 3TC + EFV | 2 (7.7) | 0 | 0 | 2 |
| DDI + ZDV + 3TC | 1 (3.8) | 1 (8.3) | 1 (12.5) | 3 |
| DDI + D4T + IDV | 2 (7.7) | 1 (8.3) | 0 | 3 |
| DDI + ZDV + IDV | 0 | 0 | 1 (12.5) | 1 |
| D4T + 3TC + IDV | 1 (3.8) | 1 (8.3) | 1 (12.5) | 3 |
| ZDV + 3TC + IDV | 2 (7.7) | 0 | 1 (12.5) | 3 |
| DDI + 3TC + IDV | 0 | 0 | 1 (12.5) | 1 |

*ZDV = zidovudine, 3TC = lamivudine, NVP = nevirapine, EFV = efavirenz, D4T = stavudine, DDI = didanosine, IDV = indinavir

Figure 2: Distribution of NRTI and NNRTI drugs resistance mutations according to subtype.

A)



B)

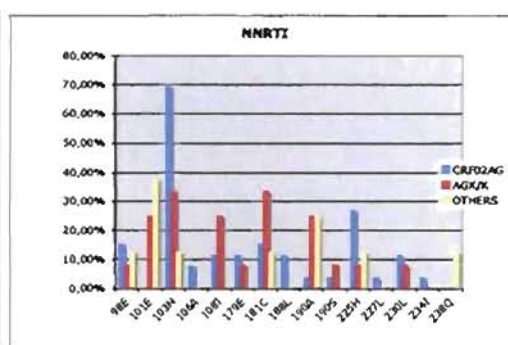
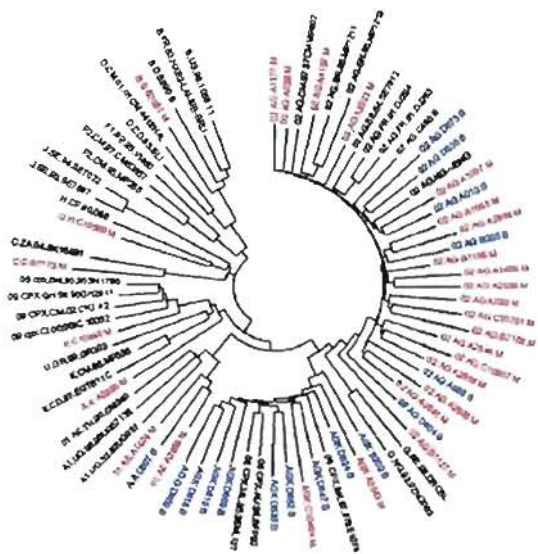
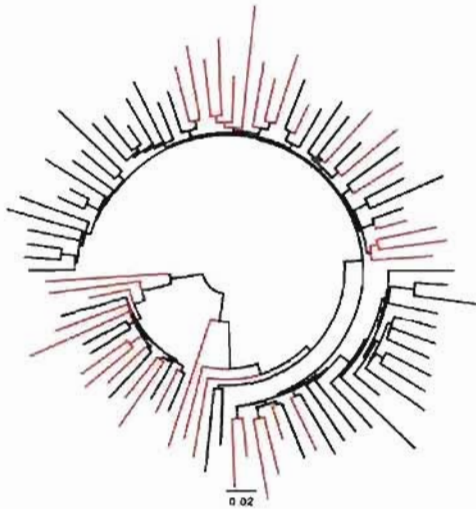


Figure 3: Phylogenetic Analysis of 46 viral sequences



Sequences from Mali are shown in Red and from Burkina Faso in Blue.

Figure 4: ML tree of all AG and AGK sequences from this study along with the most closely related from the LANL HIV database.



Red branches correspond to sequences from this study. The random probability of observing this level of clustering is < 0.001 .

3- DISCUSSION

Notre étude porte sur la plus grande cohorte de sujets VIH+ traités jamais réalisée au Mali et au Burkina Faso.

La première partie a traité de la réponse virologique à un traitement antirétroviral de routine dans des communautés urbaines qui sont à majorité pauvres donc très sensibles dans un cadre de santé précaire, composée dans la plupart des cas de femmes et de personnes non scolarisées. On se serait attendu à une mauvaise observance et une mauvaise adhérence au traitement vu le cadre socio économique (transport du lieu d'habitation au centre santé, oubli dans la prise effective des médicaments, stigmatisation et notification des cas). Nos résultats ont prouvé tout le contraire. En effet, plus de 77 % de nos 801 patients avaient une charge virale indétectable lors du premier contrôle. La proportion des personnes dont la charge virale reste positive après l'intervention nous montre que dans ces communautés, le problème d'adhérence ne se pose pas. La réaction des patients vis à vis des traitements est presque similaire à ceux des pays développés, confirmant ainsi les données publiées par Ivers *et al.* en 2005 sur l'efficacité du traitement antiretroviral dans un contexte de pauvreté. Ceci amène à dire qu'il est possible de traiter des patients africains avec les mêmes régimes thérapeutiques que ceux des pays développés. Les faibles charges virales détectées chez certains patients suggèrent un renforcement dans l'intervention d'adhérence et une optimisation du traitement. Le risque d'apparition de la résistance devient grand pour ceux dont la virémie est persistante (Sungkanuparph *et al.*, 2006). La plupart des patients qui ont eu une charge virale élevée après la deuxième visite ont développé de la résistance. Mais il est à remarquer que nous n'avions pas de génotypes pour ces patients avant le début de traitement, donc nous ne pouvons pas éliminer une résistance primaire pour certains

d'entre eux. Il se peut donc que les deux phénomènes étaient impliqués chez cette sous-population, soit : l'observance déficiente et la résistance primaire.

La seconde partie de notre étude a consisté à étudier le polymorphisme génétique des patients de notre cohorte dont la charge virale est restée détectable après l'intervention, par la caractérisation des mutations de résistance au niveau du gène *pol*, principale cible thérapeutique disponible en Afrique. Notre travail a montré la prédominance du CRF02_AG au Mali et au Burkina Faso, confirmant ainsi les données qui avaient été publiés auparavant pour la région (Nadembega *et al.*, 2006). À cette prédominance, on y a remarqué la circulation de sous-type A, de sous-type B et de CRF06_cpx, un recombinant complexe qui a été caractérisé dans l'article mentionné plus haut et dont les résultats seront transcrits dans notre troisième partie.

Pour ce qui est des CRF02_AG, notons qu'un polymorphisme important à différents codons correspondant à des mutations de résistance a été observé sur la TI et la protéase. Sur ces deux gènes, des mutations mineures, liées au polymorphisme, étaient observées. Il s'agissait des mutations sur les codons 10, 20, 36, 63, 77 et 82 de la protéase et les codons 106, 135 et 245 de la TI. La mutation M184V/I décrite chez certains isolats CRF02_AG comme étant une mutation majeure a été retrouvée chez plusieurs patients (Konings & Nyambi, 2004). Nos résultats ont confirmé ceux des études antérieures. Ainsi, Vergne *et al.* en 2003, ainsi que Konings *et al.* en 2004, ont décrit le même polymorphisme de la protéase sur des souches CRF02_AG isolées en Espagne et au Cameroun respectivement. Ces auteurs ont noté la présence de mutations mineures L10I/V, K20I/R, M36I, L63P/H, A71V, V77I et V82I. Sur le gène de la TI, les mutations V118I, I135T, R211K et V245Q ont été

observées dans d'autres études (Konings & Nyambi, 2004; Vergne *et al.*, 2000). Mais aucune de ces mutations au niveau de la TI n'a été observée dans notre cohorte.

La variabilité à des codons impliqués dans la résistance aux ARV du CRF02_AG peut être extrapolée à l'ensemble des sous-types non-B pour lesquels le polymorphisme concerne 40% des 240 acides aminés de la TI et 30% des 99 acides aminés de la protéase (Kantor & Katzenstein, 2003; Pieniazek *et al.*, 2000; Vergne *et al.*, 2000). En l'absence de données, la question du comportement de ces variants vis-à-vis des ARV reste posée, cette variabilité pouvant influencer les mécanismes de résistance du virus et les bénéfices à long terme de la HAART. C'est un domaine d'étude que l'on gagnerait à explorer dans le souci d'une prise en charge thérapeutique plus efficace. Dans les pays développés, qui ont une population de patients infectés majoritairement traitée par des ARV, la prévalence de la résistance primaire est estimée entre 10 et 20% lors des séroconversions (Chaix *et al.*, 2003). Dans les pays en développement, il existe peu de données sur la résistance primaire avant les années 2000 (Vergne *et al.*, 2000). Dans la majorité des cas, il n'existait pas de mutations de résistance aux différentes molécules. Une étude a rapporté la circulation de souches CRF01_AE et A isolées chez des patients naïfs portant la mutation K103N (Akinsete *et al.*, 2004). Dans notre étude, nous avons retrouvé des mutations de résistance aux trois principales classes d'ARV chez des patients naïfs avant le début de l'étude. Il s'agissait de mutations de résistance aux INTI (M41L, L210W, T215Y, D67N, K70R, T215F, K219Q/E, M184I/V et Q151M), aux INNTI (Y181C, G190A/S, P225H et K101E) et des mutations de résistance aux inhibiteurs de protéase (G48W, I54V et V82A/T). La circulation de mutants résistants peut s'expliquer par le fait qu'il y ait un approvisionnement désorganisé des différentes drogues qui a favorisé leur émergence, surtout dans des pays où l'accès au traitement antirétroviral n'est pas universel.

Notre étude, enfin, est à ce jour la plus large qui traite des virus qui sont de type K au niveau de la TI et a démontré de nouvelles tendances au niveau de ce sous-type.

L'analyse phylogénétique de nos résultats nous démontre que la forte prévalence des AGK parmi les patients résistants n'est pas due à une infection primaire avec un virus résistant circulant. En plus, les profils de résistance diffèrent selon les sujets. Bien que 8 de nos 9 patients AGK viennent d'un même site, il n'y a aucun lien épidémiologique entre eux, à l'exception de deux qui forment un couple. Les distances génétiques entre les différents isolats sont toutefois très petites.

Au niveau des mutations de résistance aux NRTI, nos résultats ont montré une tendance selon laquelle les patients dont la TI est de sous-type K, évolueraient préférentiellement vers les TAM2 (D67N, K70R, T215F, K219Q/E) contrairement à ceux couramment observées chez les sous-type CRF02_AG et les sous-types B qui eux ont tendance à acquérir plus vite les TAM1 (M41L, L210W, T215Y) (Laurent *et al.*, 2002; Osmanov *et al.*, 2002).

L'analyse de nos résultats suggère qu'il y aurait des différences dans l'évolution moléculaire de la résistance au niveau de ces sous-types. Dans notre cohorte, les patients ont tous été presque soumis au même régime. Aucun des patients sous D4T n'a développé de TAM. On ne pourrait dès lors attribuer les préférences d'évolution vers les différents TAMs à la différence des traitements. Au niveau des INNRTI, nos résultats ont aussi démontré que les sous-types AGK font plus fréquemment des mutations Y181C que la K103N, ce qui est tout le contraire au niveau des sous-types AG.

Enfin, il est à noter que, de manière globale, 6 de nos patients séquencés n'ont révélé aucune mutation de résistance. Au second time point, 20 des 46 patients dont nous avons les génotypages complets avaient, outre les TAM, la mutation M184V, compromettant ainsi leurs options thérapeutiques ultérieures. 20 autres patients avaient des profils de mutations favorables. 14 des 46 sujets ont en plus de la 184V, une NNRTI. 2 patients ont seulement la 184V et 1 seul a une NNRTI et des TAM. 1 patient a la mutation complexe Q151M et des NNRTI, 1 autre, la 69S et une NNRTI et un dernier n'a seulement que des NNRTI.

Dans l'ensemble, et vus les délais dans lesquels s'est faite notre étude, on est à même de dire que les isolats VIH-1 de nos patients ont bien répondu aux différentes molécules antirétrovirales. Ceci est concordant avec la littérature récente. C'est le cas du programme d'accès aux ARV du Sénégal, où seuls 16% des patients naïfs à l'initiation des HAART développaient une mutation de résistance majeure après vingt-quatre mois de suivi clinique et biologique adéquat (Vergne *et al.*, 2000). Au Cameroun, un essai multicentrique d'une trithérapie 3TC/D4T/NVP à base de médicaments génériques a démontré l'efficacité de ce traitement (Laurent *et al.*, 2004). La fréquence d'apparition des mutations de résistance était de 7,1%. Ces résultats, conformes à l'effet attendu de la HAART, confirment la faisabilité d'un traitement antirétroviral efficace en Afrique en bénéficiant d'une mobilisation et des infrastructures optimisées. Les principales causes d'échec thérapeutique répertoriées sont probablement dues à des concentrations sub optimales d'ARV souvent liées à une mauvaise observance dont on a montré tout le contraire dans notre étude, à des arrêts thérapeutiques, à des traitements non suppressifs et à l'absence de monitoring des mutations de résistance (Adje *et al.*, 2001; Richard *et al.*, 2004; Vergne *et al.*, 2002).

Cependant, il ne faut pas négliger le fait que l'existence de polymorphisme lié au sous-type pourrait rendre certaines associations thérapeutiques moins efficaces (Vergne *et al.*, 2000; 2002). Pour optimiser les interprétations des tests de résistance de ces isolats, des algorithmes spécifiques doivent être définis en prenant en compte les différentes voies génétiques de sélection des mutations. De plus, la mobilisation internationale et l'utilisation de médicaments génériques (Laurent *et al.*, 2004) vont favoriser l'accès aux ARV à un plus grand nombre de patients. Cette mise à disposition des ARV doit nécessairement s'accompagner de mesures d'accompagnement afin d'éviter l'émergence de mutants résistants. Il s'agit de l'approvisionnement régulier des molécules dans des conditionnements adaptés, l'amélioration de l'observance, un suivi clinique et biologique adéquat et le monitoring des mutations de résistance.

La présence de recombinauts dans notre étude peut suggérer une prévalence plus élevée de CRF dans la population malienne et burkinabé et peut être extrapolée à toute la sous région étant donné le flux migratoire entre ces différents pays. L'étude de l'évolution de la diversité génétique dans cette population implique nécessairement un suivi longitudinal.

4- CONCLUSION

Les perspectives de notre étude sont diverses. L'ensemble de nos résultats est en faveur de l'établissement d'une surveillance longitudinale des isolats circulant au Mali et au Burkina Faso afin de suivre l'évolution de la prévalence des mutations de résistance et des différents sous-types de VIH-1 qui y circulent. En outre, l'étude des mécanismes de résistance dans les cohortes de patients traités permettra de comprendre les mécanismes de résistance des isolats CRF02_AG, CRF06_cpx et d'améliorer la prise en charge des patients.

Enfin, les facteurs favorisant l'émergence de nouveaux variants ou affectant la physiopathologie de l'infection, tel que la surinfection, mériteraient d'être étudiés dans ces pays qui ont une relative forte prévalence de l'infection à VIH et dont les programmes de prévention sont peu efficaces.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

1. **Adje-Toure, C. A., R. Cheingsong, J. G. Garcia-Lerma, S. Eholie, M. Y. Borget, J. M. Bouchez, R. A. Otten, C. Maurice, M. Sassan-Morokro, R. E. Ekpini, M. Nolan, T. Chorba, W. Heneine, and J. N. Nkengasong.** 2003. Antiretroviral therapy in HIV-2-infected patients: changes in plasma viral load, CD4+ cell counts, and drug resistance profiles of patients treated in Abidjan, Cote d'Ivoire. *Aids* **17**:S49-54.
2. **Adje, C., R. Cheingsong, T. H. Roels, C. Maurice, G. Djomand, W. Verbiest, K. Hertogs, B. Larder, B. Monga, M. Peeters, S. Eholie, E. Bissagene, M. Coulibaly, R. Respess, S. Z. Wiktor, T. Chorba, and J. N. Nkengasong.** 2001. High prevalence of genotypic and phenotypic HIV-1 drug-resistant strains among patients receiving antiretroviral therapy in Abidjan, Cote d'Ivoire. *J Acquir Immune Defic Syndr* **26**:501-6.
3. **Akinsete, O., D. Hirigoyen, C. Cartwright, R. Schut, R. Kantor, and K. Henry.** 2004. K103N Mutation in Antiretroviral Therapy-Naive African Patients Infected with HIV Type 1. *Clin Infect Dis* **39**:575-8. Epub 2004 Jul 30.
4. **An, W., and A. Telesnitsky.** 2002. HIV-1 genetic recombination: experimental approaches and observations. *AIDS Rev* **4**:195-212.
5. **Ariyoshi, K., M. Matsuda, H. Miura, S. Tateishi, K. Yamada, and W. Sugiura.** 2003. Patterns of point mutations associated with antiretroviral drug treatment failure in CRF01_AE (subtype E) infection differ from subtype B infection. *J Acquir Immune Defic Syndr* **33**:336-42.
6. **Bacheler, L. T., E. D. Anton, P. Kudish, D. Baker, J. Bunville, K. Krakowski, L. Bolling, M. Aujay, X. V. Wang, D. Ellis, M. F. Becker, A. L. Lasut, H. J. George, D. R. Spalding, G. Hollis, and K. Abremski.** 2000. Human immunodeficiency virus type 1 mutations selected in patients failing efavirenz combination therapy. *Antimicrob Agents Chemother* **44**:2475-84.
7. **Baird, H., Y. Gao, E. Paxinos, J. Galovich, M. Abreha, P. Mugenyi, C. Petropoulos, and E. J. Arts.** 2004. Novel mechanisms involved in non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor (NNRTI) resistance of both the subtype D HIV-1 isolate and reverse transcriptase derived from a drug-naive Ugandan. *Antiviral Therapy* **9**:S35.
8. **Ball, J. K., E. C. Holmes, H. Whitwell, and U. Desselberger.** 1994. Genomic variation of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1): molecular analyses of HIV-1 in sequential blood samples and various organs obtained at autopsy. *J Gen Virol* **75**:67-79.

9. **Bang, L. M., and L. J. Scott.** 2003. Emtricitabine: an antiretroviral agent for HIV infection. *Drugs* **63**:2413-24; discussion 2425-6.
10. **Becquart, P., N. Chomont, P. Roques, A. Ayouba, M. D. Kazatchkine, L. Belec, and H. Hocini.** 2002. Compartmentalization of HIV-1 between breast milk and blood of HIV-infected mothers. *Virology* **300**:109-1.
11. **Blower, S. M., A. N. Aschenbach, H. B. Gershengorn, and J. O. Kahn.** 2001. Predicting the unpredictable: transmission of drug-resistant HIV. *Nat Med* **7**:1016-20.
12. **Bobkov, A., E. Kazennova, L. Selimova, M. Bobkova, T. Khanina, N. Ladnaya, A. Kravchenko, V. Pokrovsky, R. Cheingsong-Popov, and J. Weber** 1998 A sudden epidemic of HIV type 1 among injecting drug users in the former Soviet Union: identification of subtype A, subtype B, and novel gagA/envB recombinants. *AIDS Res Hum Retroviruses* **14**:669-76.
13. **Boucher, C.** 1996. Rational approaches to resistance: using saquinavir. *Aids***10**:S15-9.
14. **Boucher, C. A., E. O'Sullivan, J. W. Mulder, C. Ramautarsing, P. Kellam, G. Darby, J. M. Lange, J. Goudsmit, and B. A. Larder.** 1992. Ordered appearance of zidovudine resistance mutations during treatment of 18 human immunodeficiency virus-positive subjects. *J Infect Dis* **165**:105-10.
15. **Boyer, J. C., K. Bebenek, and T. A. Kunkel.** 1992. Unequal human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase error rates with RNA and DNA templates. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**:6919-23.
16. **Boyer, P. L., S. G. Sarafianos, E. Arnold, and S. H. Hughes.** 2002. The M184V mutation reduces the selective excision of zidovudine 5'-monophosphate (AZTMP) by the reverse transcriptase of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol***76**:3248-56.
17. **Brenner BG, Oliveira M, Doualla-Bell F, Moisi DD, Ntemgwa M, Frankel F, Essex M, Wainberg MA.** 2006. HIV-1 subtype C viruses rapidly develop K65R resistance to tenofovir in cell culture. *AIDS*. 2006 Jun 12;20(9):F9-13.
18. **Bussmann H, Wester CW, Masupu KV, Peter T, Gaolekwe SM, Kim S, Reich AM, Ahn S, Wu Y, Thior I, Essex M & Marlink R.** 2004. Low CD4+ T-lymphocyte values in human immunodeficiency virus-negative adults in Botswana. *Clin Diagn Lab Immunol* 2004; **11**:930-935.
19. **Cahn P. Sued O.** 2007 Raltegravir : a new antiretroviral class for salvage therapy. *Lancet* 2007 Apr 14;369(9569):1235-6.

20. **Calazans A, Brindeiro R, Brindeiro P, Verli H, Arruda MB, Gonzalez LM, Guimaraes JA, Diaz RS, Antunes OA & Tanuri A.** 2005. Low accumulation of L90M in protease from subtype F HIV-1 with resistance to protease inhibitors is caused by the L89M polymorphism. *J Infect Dis* 2005; 191:1961-1970.
21. **Calazans, A., A. Tanuri, P. A. Brindeiro, H. Verli, L. F. M. Gonzalez, J. A. Guimarães, R. S. Diaz, O. A. C. Antunes, and R. Brindeiro.** 2004. Subtype dependent Resistance to Protease Inhibitors by the HIV-1 Protease L89M Polymorphism. 11th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. February 8-11, San Francisco, CA. **Abstract 692.**
22. **Calvez, V., D. Costagliola, D. Descamps, A. Yvon, G. Collin, A. Cecile, C. Delaugerre, F. Damond, A. G. Marcelin, S. Matheron, A. Simon, M. A.Valantin, C. Katlama, and F. Brun-Vezinet.** 2002. Impact of stavudine phenotype and thymidine analogues mutations on viral response to stavudine plus lamivudine in ALTIS2 ANRS trial. *Antivir Ther* 7:211-8.
23. **Carr, J. K., M. O. Salminen, C. Koch, D. Gotte, A. W. Artenstein, P. A. Hegerich, D. St Louis, D. S. Burke, and F. E. McCutchan.** 1996. Full-length sequence and mosaic structure of a human immunodeficiency virus type 1 isolate from Thailand. *J Virol* 70:5935-4.
24. **Chaix, M. L., D. Descamps, M. Harzic, V. Schneider, C. Deveau, C. Tamalet, I. Pellegrin, J. Izopet, A. Ruffault, B. Masquelier, L. Meyer, C. Rouzioux, F. Brun-Vezinet, and D. Costagliola.** 2003. Stable prevalence of genotypic drug resistance mutations but increase in non-B virus among patients with primary HIV-1 infection in France. *Aids* 17:2635-43.
25. **Charneau, P., A. M. Borman, C. Quillent, D. Guetard, S. Chamaret, J. Cohen, G. Remy, L. Montagnier, and F. Clavel.** 1994. Isolation and envelope sequence of a highly divergent HIV-1 isolate: definition of a new HIV-1 group. *Virology* 205:247-53.
26. **Charpentier, C., Nora, T., Tenaillon, O., Clavel, F., Hance, A.J.** 2006. Extensive recombination among human immunodeficiency virus type 1 quasiespecies makes an important contribution to viral diversity in individual patients *J. Virol*, 80, 2472-2482.
27. **Chen, Z., P. Telfier, A. Gettie, P. Reed, L. Zhang, D. D. Ho, and P. A. Marx.** 1996. Genetic characterization of new West African simian immunodeficiency virus SIVsm: geographic clustering of household-derived SIV strains with human immunodeficiency virus type 2 subtypes and genetically diverse viruses from a single feral sooty mangabey troop. *J Virol* 70:3617-27.

28. **Clavel, F., M. D. Hoggan, R. L. Willey, K. Strebel, M. A. Martin, and R. Repaske.** 1989. Genetic recombination of human immunodeficiency virus. *J Virol* **63**:1455-9.
29. **Connor, E. M., R. S. Sperling, R. Gelber, P. Kiselev, G. Scott, M. J. O'Sullivan, R. VanDyke, M. Bey, W. Shearer, R. L. Jacobson, and *et al.*** 1994. Reduction of maternal-infant transmission of human immunodeficiency virus type 1 with zidovudine treatment. Pediatric AIDS Clinical Trials Group Protocol 076 Study Group. *N Engl J Med* **331**:1173-80.
30. **Corbet, S., M. C. Muller-Trutwin, P. Versmisse, S. Delarue, A. Ayoub, J. Lewis, S. Brunak, P. Martin, F. Brun-Vezinet, F. Simon, F. Barre-Sinoussi, and P. Maucelere.** 2000. env sequences of simian immunodeficiency viruses from chimpanzees in Cameroon are strongly related to those of human immunodeficiency virus group N from the same geographic area. *J Virol* **74**:529-34.
31. **Cohen, J.** 1995. High turnover of HIV in blood revealed by new studies. *Science* **267**:179.
32. **Colson, P., I. Ravaux, N. Yahi, C. Tourres, H. Gallais, and C. Tamalet.** 2002. Transmission of HIV-1 variants resistant to the three classes of antiretroviral agents: implications for HIV therapy in primary infection. *Aids* **16**:507-9.
33. **Colson, P., M. Henry, C. Tourres, D. Lozachmeur, H. Gallais, J. A. Gastaut, J. Moreau, and C. Tamalet.** 2004. Polymorphism and drug-selected mutations in the protease gene of human immunodeficiency virus type 2 from patients living in Southern France. *J Clin Microbiol* **42**:570-7.
34. **Colonno, R. J.** 2002. Identification of amino acid substitutions correlated with reduced atazanavir susceptibility in patients treated with atazanavir-containing regimens. XI International HIV drug resistance workshop: basic principles and clinical implications 2-5 July 2002, Seville, Spain, abstract 4.
35. **Colonno, R. J., A. Thiry, K. Limoli, and N. Parkin.** 2003. Activities of atazanavir (BMS-232632) against a large panel of human immunodeficiency virus type 1 clinical isolates resistant to one or more approved protease inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother* **47**:1324-33.
36. **Condra, J. H., D. J. Holder, W. A. Schleif, O. M. Blahy, R. M. Danovich, L. J. Gabryelski, D. J. Graham, D. Laird, J. C. Quintero, A. Rhodes, H. L. Robbins, E. Roth, M. Shivaprakash, T. Yang, J. A. Chodakewitz, P. J. Deutsch, R. Y. Leavitt, F. E. Massari, J. W. Mellors, K. E. Squires, R. T. Steigbigel, H. Teppler, and E. A. Emini.** 1996. Genetic correlates of in vivo viral resistance to indinavir, a human immunodeficiency virus type 1 protease inhibitor. *J Virol* **70**:8270-6.

37. **Cozzi-Lepri A, Ruiz L, Loveday C, Phillips AN, Clotet B, Reiss P, Ledergerber B, Holkmann C, Staszewski S & Lundgren JD.** 2005. Thymidine analogue mutation profiles: factors associated with acquiring specific profiles and their impact on the virological response to therapy. *Antivir Ther* 2005; **10**:791-802.
38. **Damond, F., C. Apetrei, D. L. Robertson, S. Souquiere, A. Lepretre, S. Matheron, J. C. Plantier, F. Brun-Vezinet, and F. Simon.** 2001. Variability of human immunodeficiency virus type 2 (hiv-2) infecting patients living in france. *Virology* **280**:19-30.
39. **Delaporte E.** 2002. No difference in clinical progression between patients infected with the predominant human immunodeficiency virus type 1 circulating recombinant form (CRF) 02_AG strain and patients not infected with CRF02_AG, in Western and West-Central Africa: a four-year prospective multicenter study. *J Infect Dis* 2002; **186**:486-492.
40. **De Leys, R., B. Vanderborght, M. Vanden Haesevelde, L. Heyndrickx, A. van Geel, C. Wauters, R. Bernaerts, E. Saman, P. Nijs, B. Willems, and *et al.*** 1990. Isolation and partial characterization of an unusual human immunodeficiency retrovirus from two persons of west-central African origin. *J Virol* **64**:1207-16.
41. **Delaugerre, C., M. Mouroux, A. Yvon-Groussin, A. Simon, F. Angleraud, J. M. Huraux, H. Agut, C. Katlama, and V. Calvez.** 2001. Prevalence and conditions of selection of E44D/A and V118I human immunodeficiency virus typel reverse transcriptase mutations in clinical practice. *Antimicrob Agents Chemother* **45**:946-8.
42. **Demeter, L. M., T. Nawaz, G. Morse, R. Dolin, A. Dexter, P. Gerondelis, and R. C. Reichman.** 1995. Development of zidovudine resistance mutations in patients receiving prolonged didanosine monotherapy. *J Infect Dis* **172**:1480-5.
43. **De Meyer, S., M. Peeters, C. Jordens, P. McKenna, R. van der Geest, R. Pauwels, and M. de Béthune.** 2003. TMC114, a potent next-generation protease inhibitor: characterization of antiviral activity in multiple protease inhibitor experienced patients participating in a Phase IIa study. *Antiviral Therapy* **8**:S18.
44. **Derdeyn, C. A., J. M. Decker, J. N. Sfakianos, Z. Zhang, W. A. O'Brien, L. Ratner, G. M. Shaw, and E. Hunter.** 2001. Sensitivity of human immunodeficiency virus type 1 to fusion inhibitors targeted to the gp41 first heptad repeat involves distinct regions of gp41 and is consistently modulated by gp120 interactions with the coreceptor. *J Virol* **75**:8605-14.

45. **Descamps, D., C. Apetrei, G. Collin, F. Damond, F. Simon, and F. Brun-Vezinet.** 1998. Naturally occurring decreased susceptibility of HIV-1 subtype G to protease inhibitors. *Aids* **12**:1109-11.
46. **Descamps, D., P. Flandre, V. Calvez, G. Peytavin, V. Meiffredy, G. Collin, C. Delaugerre, S. Robert-Delmas, B. Bazin, J. P. Aboulker, G. Pialoux, F. Raffi, and F. Brun-Vezinet.** 2000. Mechanisms of virologic failure in previously untreated HIV infected patients from a trial of induction-maintenance therapy. Trilege (Agence Nationale de Recherches sur le SIDA 072) Study Team). *JAMA* **283**:205-11.
47. **Deprez, E., S. Barbe, M. Kolaski, H. Leh, F. Zouhiri, C. Auclair, J. C. Brochon, M. Le Bret, and J. F. Mouscadet.** 2004. Mechanism of HIV-1 integrase inhibition by styrylquinoline derivatives in vitro. *Mol Pharmacol* **65**:85-98.
48. **De Ronde, A., M. van Dooren, L. van Der Hoek, D. Bouwhuis, E. de Rooij, B. van Gemen, R. de Boer, and J. Goudsmit.** 2001. Establishment of new transmissible and drug-sensitive human immunodeficiency virus type 1 wild types due to transmission of nucleoside analogue-resistant virus. *J Virol* **75**:595-602.
49. **Duran AS, Losso MH, Salomon H, Harris DR, Pampuro S, Soto-Ramirez LE, Duarte G, de Souza RS, Read JS; NISDI Perinatal Study Group.** 2007. Drug resistance among HIV-infected pregnant women receiving antiretrovirals for prophylaxis *AIDS* 2007 Jan 11;21(2):199-205.
50. **Egger, M., M. May, G. Chene, A. N. Phillips, B. Ledergerber, F. Dabis, D. Costagliola, A. D'Arminio Monforte, F. de Wolf, P. Reiss, J. D. Lundgren, A. C. Justice, S. Staszewski, C. Leport, R. S. Hogg, C. A. Sabin, M. J. Gill, B. Salzberger, and J. A. Sterne.** 2002. Prognosis of HIV-1-infected patients starting highly active antiretroviral therapy: a collaborative analysis of prospective studies. *Lancet* **360**:119-29.
51. **Ekpini, R. A., J. N. Nkengasong, T. Sibailly, C. Maurice, C. Adje, B. B. Monga, T. H. Roels, A. E. Greenberg, and S. Z. Wiktor.** 2002. Changes in plasma HIV-1-RNA viral load and CD4 cell counts, and lack of zidovudine resistance among pregnant women receiving short-course zidovudine. *Aids* **16**:625-30.
52. **Eshleman, S. H., M. Mracna, L. A. Guay, M. Deseyve, S. Cunningham, M. Mirochnick, P. Musoke, T. Fleming, M. Glenn Fowler, L. M. Mofenson, F. Mmiro, and J. B. Jackson.** 2001. Selection and fading of resistance mutations in women and infants receiving nevirapine to prevent HIV-1 vertical transmission (HIVNET 012). *Aids* **15**:1951-7.

53. **Eshleman, S. H., P. Krogstad, J. B. Jackson, Y. G. Wang, S. Lee, L. J. Wei, S. Cunningham, M. Wantman, A. Wiznia, G. Johnson, S. Nachman, and P. Palumbo.** 2001. Analysis of human immunodeficiency virus type 1 drug resistance in children receiving nucleoside analogue reverse-transcriptase inhibitors plus nevirapine, nelfinavir, or ritonavir (Pediatric AIDS Clinical Trials Group 377). *J Infect Dis* **183**:1732-8. Epub 2001 May 16.
54. **Ferré, V., C. Allavena, I. Poizot-Martin, G. Beck-Wirth, P. Perré, F. Raffi, I. Cohen, and C. a. t. B. S. Group.** 2003. Biks study (Lopinavir/Ritonavir Efavirenz combination): complete 24 - week results. *Antiviral Therapy* **8**:S193.
55. **Fleury, H., P. Recordon-Pinson, A. Caumont, M. Faure, P. Roques, J. C. Plantier, E. Couturier, D. Dormont, B. Masquelier, and F. Simon.** 2003. HIV type 1 diversity in France, 1999-2001: molecular characterization of non-B HIV type 1 subtypes and potential impact on susceptibility to antiretroviral drugs. *AIDS Res Hum Retroviruses* **19**:41-7.
56. **Gallego, O., C. de Mendoza, A. Corral, and V. Soriano.** 2003. Low rate of HIV-1 codon 215 revertants in antiretroviral-experienced patients. *Aids* **17**:919-21.
57. **Gao, F., E. Bailes, D. L. Robertson, Y. Chen, C. M. Rodenburg, S. F. Michael, L. B. Cummins, L. O. Arthur, M. Peeters, G. M. Shaw, P. M. Sharp, and B. H. Hahn.** 1999. Origin of HIV-1 in the chimpanzee *Pan troglodytes* troglodytes. *Nature* **397**:436-41.
58. **Gao, F., L. Yue, A. T. White, P. G. Pappas, J. Barchue, A. P. Hanson, B. M. Greene, P. M. Sharp, G. M. Shaw, and B. H. Hahn.** 1992. Human infection by genetically diverse SIVSM-related HIV-2 in west Africa. *Nature* **358**:495-9.
59. **Gao, F., L. Yue, D. L. Robertson, S. C. Hill, H. Hui, R. J. Biggar, A. E. Neequaye, T. M. Whelan, D. D. Ho, G. M. Shaw, and *et al.*** 1994. Genetic diversity of human immunodeficiency virus type 2: evidence for distinct sequence subtypes with differences in virus biology. *J Virol* **68**:7433-47.
60. **Garcia-Lerma, J. G., S. Nidtha, K. Blumoff, H. Weinstock, and W. Heneine.** 2001. Increased ability for selection of zidovudine resistance in a distinct class of wild-type HIV-1 from drug-naïve persons. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**:13907-12. Epub 2001 Nov 6.
61. **Grant, R. M., F. M. Hecht, M. Warmerdam, L. Liu, T. Liegler, C. J. Petropoulos, N. S. Hellmann, M. Chesney, M. P. Busch, and J. O. Kahn.** 2002. Time trends in primary HIV-1 drug resistance among recently infected persons. *JAMA* **288**:181-8.

62. **Grinsztejn B, Nguyen BY, Katlama C, Gatell JM, Lazzarin A, Vittecoq D, Gonzalez CJ, Chen J, Harvey CM, Isaacs RD; Protocol 005 Team .2007.** Safety and efficacy of the HIV-1 integrase inhibitor raltegravir (MK-0518) in treatment- experienced patients with multidrug-resistant virus: a phase II randomised controlled trial. *Lancet.* 2007 Apr 14;369(9569):1261-9.
63. **Grossman, Z., E. E. Paxinos, D. Averbuch, S. Maayan, N. T. Parkin, D. Engelhard, M. Lorber, V. Istomin, Y. Shaked, E. Mendelson, D. Ram, C. J. Petropoulos, and J. M. Schapiro.** 2004. Mutation D30N is not preferentially selected by human immunodeficiency virus type 1 subtype C in the development of resistance to nelfinavir. *Antimicrob Agents Chemother* **48**:2159-65.
64. **Gurtler, L. G., P. H. Hauser, J. Eberle, A. von Brunn, S. Knapp, L. Zekeng, J. M. Tsague, and L. Kaptue.** 1994. A new subtype of human immunodeficiency virus type 1 (MVP-5180) from Cameroon. *J Virol* **68**:1581-5.
65. **Hall, D., S. McCallister, D. Neubacher, M. Kraft, and D. Mayers.** 2003. Characterization of treatment-emergent resistance mutations in two Phase II study of tipranavir. *Antiviral Therapy* **8**:S16.
66. **Hazuda, D. J., and a. t. M. H.-D. D. Team.** 2003. The identification of active site mutations that confer resistance to structurally diverse inhibitors of HIV-1 integrase strand transfer supports a general mechanism of phosphotransferase inhibito. *Antiviral Therapy* **8**:S13.
67. **Hertogs, K., S. Bloor, V. De Vroey, C. van Den Eynde, P. Dehertogh, A. Van Cauwenberge, M. Sturmer, T. Alcorn, S. Wegner, M. van Houtte, V. Miller, and B. A. Larder.** 2000. A novel human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase mutational pattern confers phenotypic lamivudine resistance in the absence of mutation 184V. *Antimicrob Agents Chemother* **44**:568-73.
68. **Ho, D. D., A. U. Neumann, A. S. Perelson, W. Chen, J. M. Leonard, and M. Markowitz.** 1995. Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. *Nature* **373**:123-6.
69. **Hogg, R. S., B. Yip, K. J. Chan, E. Wood, K. J. Craib, M. V. O'Shaughnessy, and J. S. Montaner.** 2001. Rates of disease progression by baseline CD4 cell count and viral load after initiating triple-drug therapy. *JAMA* **286**:2568-77.
70. **Holguin, A., A. Alvarez, M. J. Pena, F. Artiles, L. Molina, and V. Soriano.** 2003. HIV-positive immigrants in the Canary Islands, Spain: implications for public health in Europe. *HIV Clin Trials* **4**:184-92.
71. **Holguin A, Faudon JL, Labernardiere JL, Soriano V.** 2007. Susceptibility of HIV-1 non-B subtypes and recombinant variants to Enfuvirtide. *J Clin Virol.* 2007 Feb;38(2):176-80. Epub 2006 Dec 29.

72. **Hu Z, Giguel F, Hatano H, Reid P, Lu J & Kuritzkes DR.** Fitness comparison of thymidine analog resistance pathways in human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 2006; **80**:7020-7027.
73. **Hudson RR.** 2000. A new statistic for detecting genetic differentiation. *Genetics* 2000; **155**:2011-2014.
74. **Ivers LC, Kendrick D, Doucette K.** 2005. Efficacy of antiretroviral therapy programs in resource-poor settings: a meta-analysis of the published literature. *Clin Infect Dis.* 2005 Jul 15;41(2):217-24.
75. **Janssens, W., A. Buve, and J. N. Nkengasong.** 1997. The puzzle of HIV-1 subtypes in Africa. *Aids* **11**:705-12.
76. **Johnson, V. A., F. Brun-Vezinet, B. Clotet, B. Conway, R. T. D'Aquila, L. M. Demeter, D. R. Kuritzkes, D. Pillay, J. M. Schapiro, A. Telenti, and D. D. Richman.** 2003. Drug resistance mutations in HIV-1. *Top HIV Med* **11**:215-21.
77. **Kalish, M. L., A. Baldwin, S. Raktham, C. Wasi, C. C. Luo, G. Schochetman, T. D. Mastro, N. Young, S. Vanichseni, H. Rubsamen-Waigmann, and et al.,** 1995. The evolving molecular epidemiology of HIV-1 envelope subtypes in injecting drug users in Bangkok, Thailand: implications for HIV vaccine trials. *Aids* **9**:851-7.
78. **Kanki, P. J., M. Peeters, and A. Gueye-Ndiaye.** 1997. Virology of HIV-1 and HIV-2: implications for Africa. *Aids* **11**:S33-42.
79. **Kantor, R., and D. Katzenstein.** 2003. Polymorphism in HIV-1 non-subtype B protease and reverse transcriptase and its potential impact on drug susceptibility and drug resistance evolution. *AIDS Rev* **5**:25-35.
80. **Kantor, R., L. S. Zijenah, R. W. Shafer, S. Mutetwa, E. Johnston, R. Lloyd, A. von Lieven, D. Israelski, and D. A. Katzenstein.** 2002. HIV-1 subtype C reverse transcriptase and protease genotypes in Zimbabwean patients failing antiretroviral therapy. *AIDS Res Hum Retroviruses* **18**:1407-13.
81. **Kaufmann, G. R., L. Perrin, G. Pantaleo, M. Opravil, H. Furrer, A. Telenti, B. Hirschel, B. Ledergerber, P. Vernazza, E. Bernasconi, M. Rickenbach, M. Egger, and M. Battegay.** 2003. CD4 T-lymphocyte recovery in individuals with advanced HIV1 infection receiving potent antiretroviral therapy for 4 years: the Swiss HIV Cohort Study. *Arch Intern Med* **163**:2187-95.

82. **Kellam, P., C. A. Boucher, and B. A. Larder.** 1992. Fifth mutation in human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase contributes to the development of high-level resistance to zidovudine. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**:1934-8.
83. **Kellam, P., and B. A. Larder.** 1995. Retroviral recombination can lead to linkage of reverse transcriptase mutations that confer increased zidovudine resistance. *J Virol* **69**:669-74.
84. **Kempf, D. J., J. D. Isaacson, M. S. King, S. C. Brun, Y. Xu, K. Real, B. M. Bernstein, A. J. Japour, E. Sun, and R. A. Rode.** 2001. Identification of genotypic changes in human immunodeficiency virus protease that correlate with reduced susceptibility to the protease inhibitor lopinavir among viral isolates from protease inhibitor-experienced patients. *J Virol* **75**:7462-9.
85. **Kilby, J. M., and J. J. Eron.** 2003. Novel therapies based on mechanisms of HIV-1 cell entry. *N Engl J Med* **348**:2228-38.
86. **King, N. M., M. Prabu-Jeyabalan, P. Wigerinck, M. de Béthune, and C. A. Schiffer.** 2003. TMC114 binds within the substrate envelope of HIV-1 protease, which could account for its efficacy against multi-protease inhibitor resistant virus. *Antiviral Therapy* **8**:S19.
87. **Kliger, Y., and Y. Shai.** 2000. Inhibition of HIV-1 entry before gp41 folds into its fusion-active conformation. *J Mol Biol* **295**:163-8.
88. **Konings, F. A., and P. N. Nyambi.** 2004. V118I substitution in the reverse transcriptase gene of HIV type 1 CRF02_AG strains infecting drug-naïve individuals in Cameroon. *AIDS Res Hum Retroviruses* **20**:673-8.
89. **Konings, F. A., P. Zhong, M. Agwara, L. Agyingi, L. Zekeng, J. M. Achkar, L. Ewane, Saa, E. Afane Ze, T. Kinge, and P. N. Nyambi.** 2004. Protease mutations in HIV-1 non-B strains infecting drug-naïve villagers in Cameroon. *AIDS Res Hum Retroviruses* **20**:105-9.
90. **Kuehn BM.** **UNAIDS report:** AIDS epidemic slowing, but huge challenges remain. *JAMA* 2006; **296**:29-30.
91. **Kumar M, Jain SK, Pasha ST, Chattopadhyaya D, Lal S & Rai A.** 2006. Genomic diversity in the regulatory nef gene sequences in Indian isolates of HIV type 1: emergence of a distinct subclade and predicted implications. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2006; **22**:1206- 1219.

92. **Kuritzkes DR, Bassett RL, Hazelwood JD, Barrett H, Rhodes RA, Young RK & Johnson VA.** 2004. Rate of thymidine analogue resistance mutation accumulation with zidovudine- or stavudine-based regimens. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2004; **36**:600-603.
93. **Lan, N. T., P. Recordon-Pinson, P. V. Hung, N. T. Uyen, T. T. Lien, H. T. Tien, I. Garrigue, M. H. Schrive, I. Pellegrin, M. E. Lafon, J. P. Aboulker, F. Barre-Sinoussi, and H. J. Fleury.** 2003. HIV type 1 isolates from 200 untreated individuals in Ho Chi Minh City (Vietnam): ANRS 1257 Study. Large predominance of CRF01_AE and presence of major antiretroviral drugs. *AIDS Res Hum Retroviruses* **19**:925-8.
94. **Lacey, S. F., and B. A. Larder.** 1994. Novel mutation (V75T) in human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase confers resistance to 2',3'-dideoxy-2',3'-dideoxythymidine in cell culture. *Antimicrob Agents Chemother* **38**:1428-32.
95. **Laurent C, Bourgeois A, Faye MA, Mougnotou R, Seydi M, Gueye M, Liegeois F, Kane CT, Butel C, Mbuagbaw J, Zekeng L, Mboup S, Mpoudi-Ngole E, Peeters M & Delaporte E.** 2002. No difference in clinical progression between patients infected with the predominant human immunodeficiency virus type 1 circulating recombinant form (CRF) 02_AG strain and patients not infected with CRF02_AG, in Western and West-Central Africa: a four-year prospective multicenter study. *J Infect Dis* 2002; **186**:486-492.
96. **Laurent, C., C. Kouanfack, S. Koulla-Shiro, N. Nkoue, A. Bourgeois, A. Calmy, B. Lactuock, V. Nzeusseu, R. Mougnotou, G. Peytavin, F. Liegeois, E. Nerrienet, M. Tardy, M. Peeters, I. Andrieux-Meyer, L. Zekeng, M. Kazatchkine, E. Mpoudi-Ngole, and E. Delaporte.** 2004. Effectiveness and safety of a generic fixed-dose combination of nevirapine, stavudine, and lamivudine in HIV-1 infected adults in Cameroon: open-label multicentre trial. *Lancet* **364**:29-34.
97. **Larder, B. A., and S. D. Kemp.** 1989. Multiple mutations in HIV-1 reverse transcriptase confer high-level resistance to zidovudine (AZT). *Science* **246**:1155-8.
98. **Larder, B. A., S. Bloor, S. D. Kemp, K. Hertogs, R. L. Desmet, V. Miller, M. Sturmer, S. Staszewski, J. Ren, D. K. Stammers, D. I. Stuart, and R. Pauwels.** 1999. A family of insertion mutations between codons 67 and 70 of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase confer multinucleoside analog resistance. *Antimicrob Agents Chemother* **43**:1961-7.

99. **Leroy, V., J. M. Karon, A. Alioum, E. R. Ekpini, N. Meda, A. E. Greenberg, P. Msellati, M. Hudgens, F. Dabis, and S. Z. Wiktor.** 2002. Twenty-four month efficacy of a maternal short-course zidovudine regimen to prevent mother-to-child transmission of HIV-1 in West Africa. *Aids* **16**:631-41.
100. **Maddison WP & Maddison DR.** 2001. *MacClade - Analysis of Phylogeny and Character Evolution - Version 4.* 2001. Sunderland, MA: Sinauer Associates, Inc.
101. **Liitsola, K., K. Holm, A. Bobkov, V. Pokrovsky, T. Smolskaya, P. Leinikki, S. Osmanov, and M. Salminen.** 2000. An AB recombinant and its parental HIV type 1 strains in the area of the former Soviet Union: low requirements for sequence identity in recombination. UNAIDS Virus Isolation Network. *AIDS Res Hum Retroviruses* **16**:1047-53.
102. **Lin, P. F., C. J. Gonzalez, B. Griffith, G. Friedland, V. Calvez, F. Ferchal, R. F. Schinazi, D. H. Shepp, A. B. Ashraf, M. A. Wainberg, V. Soriano, J. W. Mellors, and R. J. Colunno.** 1999. Stavudine resistance: an update on susceptibility following prolonged therapy. *Antivir Ther* **4**:21-8.
103. **Little, S. J., S. Holte, J. P. Routy, E. S. Daar, M. Markowitz, A. C. Collier, R. Koup, J. W. Mellors, E. Connick, B. Conway, M. Kilby, L. Wang, J. M. Whitcomb, N. S. Hellmann, and D. D. Richman.** 2002. Antiretroviral-drug resistance among patients recently infected with HIV. *N Engl J Med* **347**:385-94.
104. **Loussert-Ajaka, I., M. L. Chaix, B. Korber, F. Letourneur, E. Gomas, E. Allen, T. D. Ly, F. Brun-Vezinet, F. Simon, and S. Saragosti.** 1995. Variability of human immunodeficiency virus type 1 group O strains isolated from Cameroonian patients living in France. *J Virol* **69**:5640-9.
105. **Maldarelli, F., M. Kearney, S. Palmer, M. Polis, J. Mican, R. Stephens, D. Rock, J. Mellors, and Coffin.J.** 2004. HIV-1 populations are large, highly diverse, and characterized by frequent recombination in drug-naïve and drug-resistant individuals. *Antiviral Therapy* **9**:S54.
106. **Mammano, F., V. Trouplin, V. Zennou, and F. Clavel.** 2000. Retracing the evolutionary pathways of human immunodeficiency virus type 1 resistance to protease inhibitors: virus fitness in the absence and in the presence of drug. *J Virol* **74**:8524-31.
107. **Margot, N. A., E. Isaacson, I. McGowan, A. K. Cheng, R. T. Schooley, and M.D. Miller.** 2002. Genotypic and phenotypic analyses of HIV-1 in antiretroviral experienced patients treated with tenofovir DF. *Aids* **16**:1227-35.

108. **Masquelier, B., D. Breilh, D. Neau, S. Lawson-Ayayi, V. Lavignolle, J. M. Ragnaud, M. Dupon, P. Morlat, F. Dabis, and H. Fleury.** 2002. Human immunodeficiency virus type 1 genotypic and pharmacokinetic determinants of the virological response to lopinavir-ritonavir-containing therapy in protease inhibitor experienced patients. *Antimicrob Agents Chemother* **46**:2926-32.
109. **Masquelier, B., C. Tamalet, B. Montes, D. Descamps, G. Peytavin, L. Bocket, M. Wirten, J. Izopet, V. Schneider, V. Ferre, A. Ruffault, P. Palmer, A. Trylesinski, M. Miller, F. Brun-Vezinet, and D. Costagliola.** 2004. Genotypic determinants of the virological response to tenofovir disoproxil fumarate in nucleoside reverse transcriptase inhibitor-experienced patients. *Antivir Ther* **9**:315-23.
110. **Masquelier, B., E. Lemoigne, I. Pellegrin, D. Douard, B. Sandler, and H. J. Fleury.** 1993. Primary infection with zidovudine-resistant HIV. *N Engl J Med* **329**:1123-4.
111. **Masquelier, B., E. Race, C. Tamalet, D. Descamps, J. Izopet, C. Buffet-Janvresse, A. Ruffault, A. S. Mohammed, J. Cottalorda, A. Schmuck, V. Calvez, E. Dam, H. Fleury, and F. Brun-Vezinet.** 2001. Genotypic and phenotypic resistance patterns of human immunodeficiency virus type 1 variants with insertions or deletions in the reverse transcriptase (RT): multicenter study of patients treated with RT inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother* **45**:1836-42.
112. **Masquelier, B., G. Peytavin, C. Leport, C. Droz, S. Duran, R. Verdon, J. M. Besnier, G. Chene, F. Raffi, and F. Brun-Vezinet.** 2002. Mechanisms of early virologic failure in antiretroviral-naive patients starting protease inhibitor-containing regimens: the APROVIR Study. *J Infect Dis* **186**:1503-7. Epub 2002 Oct 23.
113. **McCallister, S., V. Kohlbrenner, K. Squires, A. Lazzarin, P. Kumar, E. DeJesus, J. Nadler, J. Gallant, S. Walmsley, P. Yeni, J. Leith, C. Dohnanyi, D. Hall, J. Sabo, T. MacGregor, W. Verbiets, P. McKenna, and D. Mayers.** 2003. Characterization of the impact of genotype, phenotype, and inhibitory quotient on antiretroviral activity of tipranavir in highly treatment-experienced patients. *Antiviral Therapy* **8**:S15.
114. **McCutchan FE.** 2002. Global epidemiology of HIV. *J Med Virol.* 2006; **78** Suppl 1:S7 S12.
115. **McCutchan FE, Carr JK, Bajani M, Sanders-Buell E, Harry TO, Stoeckli TC, Robbins KE, Gashau W, Nasidi A, Janssens W & Kalish ML.** 2002. Subtype G and multiple forms of A/G intersubtype recombinant human immunodeficiency virus type 1 in Nigeria. *Virology* 1999; **254**:226-234.

116. **McGrath, K. M., N. G. Hoffman, W. Resch, J. A. Nelson, and R. Swanstrom.** 2001. Using HIV-1 sequence variability to explore virus biology. *Virus Res* 76:137-60.
117. **Metzner KJ, Allers K., Rauch P., Harrer T.** 2007 . Rapid selection of drug-resistant HIV-1 during the first months of suppressive ART in treatment-naïve patients. *AIDS*. 2007 Mar 30;21(6):703-11.
118. **Miralles, G. D., T. Melby, R. DeMasi, Y. Zhang, G. Heilek-Snyder, and M. Greenberg.** 2004. Withdrawal of fusion inhibitors from a failing antiretroviral regimen results in reversion to enfuvirtide susceptibility. *Antiviral Therapy* 9:S12.
119. **Mo, H. M., M. Parkin, K. D. Stewart, L. Lu, T. Dekhtyr, D. Kempf, and A. Molla.** 2003. I84A and I84C mutations in protease confer high level resistance to protease inhibitors and impair replication capacity. *Antiviral Therapy* 8:S51.
120. **Molla, A., M. Korneyeva, Q. Gao, S. Vasavanonda, P. J. Schipper, H. M. Mo, M. Markowitz, T. Chernyavskiy, P. Niu, N. Lyons, A. Hsu, G. R. Granneman, D. D. Ho, C. A. Boucher, J. M. Leonard, D. W. Norbeck, and D. J. Kempf.** 1996. Ordered accumulation of mutations in HIV protease confers resistance to ritonavir. *Nat Med* 2:760-6.
121. **Montaner, J. S., H. C. Cote, M. Harris, R. S. Hogg, B. Yip, J. W. Chan, P. R. Harrigan, and M. V. O'Shaughnessy.** 2003. Mitochondrial toxicity in the era of HAART: evaluating venous lactate and peripheral blood mitochondrial DNA in HIV-infected patients taking antiretroviral therapy. *J Acquir Immune Defic Syndr* 34:S85-90.
122. **Montavon, C., C. Toure-Kane, F. Liegeois, E. Mpoudi, A. Bourgeois, L. Vergne, J. L. Perret, A. Boumah, E. Saman, S. Mboup, E. Delaporte, and M. Peeters.** 2000. Most env and gag subtype A HIV-1 viruses circulating in West and West Central Africa are similar to the prototype AG recombinant virus IBNG. *J Acquir Immune Defic Syndr* 23:363-74.
123. **Montavon, C., C. Toure-Kane, J. N. Nkengasong, L. Vergne, K. Hertogs, S. Mboup, E. Delaporte, and M. Peeters.** 2002. CRF06-cpx: a new circulating recombinant form of HIV-1 in West Africa involving subtypes A, G, K, and J. *J Acquir Immune Defic Syndr* 29:522-30.
124. **Montes, B., L. Vergne, M. Peeters, J. Reynes, E. Delaporte, and M. Segondy.** 2004. Comparison of Drug Resistance Mutations and Their Interpretation in Patients Infected With Non-B HIV-1 Variants and Matched Patients Infected With HIV-1 Subtype B. *J Acquir Immune Defic Syndr* 35:329-336.

125. **Mouroux, M., D. Descamps, J. Izopet, A. Yvon, C. Delaugerre, S. Matheron, Coutellier, M. A. Valantin, M. Bonmarchand, H. Agut, P. Massip, D. Costagliola, C. Katlama, F. Brun-Vezinet, and V. Calvez.** 2001. Low-rate emergence of thymidine analogue mutations and multi-drug resistance mutations in the HIV-1 reverse transcriptase gene in therapy-naïve patients receiving stavudine plus lamivudine combination therapy. *Antivir Ther* **6**:179-83.
126. **Nadembega WM, Giannella S, Simpoire J, Ceccherini-Silberstein F, Pietra V, Bertoli A, Pignatelli S, Bellocchi MC, Nikiema JB, Cappelli G, Bere A, Colizzi V, Perno CP & Musumeci S.** 2006. Characterization of drug-resistance mutations in HIV-1 isolates from non-HAART and HAART treated patients in Burkina Faso. *J Med Virol* 2006; **78**:1385-1391.
127. **Naeger, L. K., N. A. Margot, and M. D. Miller.** 2001. Increased drug susceptibility of HIV-1 reverse transcriptase mutants containing M184V and zidovudine-associated mutations: analysis of enzyme processivity, chain-terminator removal and viral replication. *Antivir Ther* **6**:115-26.
128. **Nikolenko, G. N., S. Palmer, F. Maldarelli, J. W. Mellors, J. M. Coffin, and V. K. Pathak.** 2004. Mutations in HIV-1 RNase H domain confer high-level resistance to nucleoside reverse transcriptase inhibitors and provide novel insights into the mechanism of nucleotide excision-mediated drug resistance. *Antiviral Therapy* **9**:S26.
129. **Nolan, M., M. G. Fowler, and L. M. Mofenson.** 2002. Antiretroviral prophylaxis of perinatal HIV-1 transmission and the potential impact of antiretroviral resistance. *J Acquir Immune Defic Syndr* **30**:216-29.
130. **Nora, T., Charpentier, C., Tenaillon, O., Hoede, C., Clavel, F., Hance, A. J.** 2007. Contribution of Recombination to the Evolution of Human Immunodeficiency Viruses Expressing Resistance to Antiretroviral Treatment. *J. Virol.* **81**: 7620-7628.
131. **Nowak, P., A. C. Karlsson, L. Naver, A. B. Bohlin, A. Piasek, and A. Sonnerborg.** 2002. The selection and evolution of viral quasispecies in HIV-1 infected children. *HIV Med* **3**:1-11.
132. **Osmanov S, Pattou C, Walker N, Schwardlander B & Esparza J.** 2002. Estimated global distribution and regional spread of HIV-1 genetic subtypes in the year 2000. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2002; **29**:184-190.
133. **Palella, F. J., Jr., K. M. Delaney, A. C. Moorman, M. O. Loveless, J. Fuhrer, G. A. Satten, D. J. Aschman, and S. D. Holmberg.** 1998. Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection. HIV Outpatient Study Investigators. *N Engl J Med* **338**:853-60.

134. **Palmer, S., A. Alaeus, J. Albert, and S. Cox.** 1998. Drug susceptibility of subtypes A,B,C,D, and E human immunodeficiency virus type 1 primary isolates. *AIDS Res Hum Retroviruses* **14**:157-62.
135. **Parkin, N. T., and J. M. Schapiro.** 2004. Antiretroviral drug resistance in nonsubtype B HIV-1, HIV-2 and SIV. *Antivir Ther* **9**:3-12.
136. **Patick, A. K., M. Duran, Y. Cao, D. Shugarts, M. R. Keller, E. Mazabel, M. Knowles, S. Chapman, D. R. Kuritzkes, and M. Markowitz.** 1998. Genotypic and phenotypic characterization of human immunodeficiency virus type 1 variants isolated from patients treated with the protease inhibitor nelfinavir. *Antimicrob Agents Chemother* **42**:2637-44.
137. **Partaledis, J. A., K. Yamaguchi, M. Tisdale, E. E. Blair, C. Falcione, B. Maschera, R. E. Myers, S. Pazhanisamy, O. Futer, A. B. Cullinan, and *et al.*** 1995. In vitro selection and characterization of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) isolates with reduced sensitivity to hydroxyethylamino sulfonamide inhibitors of HIV-1 aspartyl protease. *J Virol* **69**:5228-35.
138. **Peeters, M., and P. M. Sharp.** 2000. Genetic diversity of HIV-1: the moving target. *Aids* **14**:S129-40.
139. **Peeters, M., E. Esu-Williams, L. Vergne, C. Montavon, C. Mulanga-Kabeya, T. Harry, A. Ibironke, D. Lesage, D. Patrel, and E. Delaporte.** 2000. Predominance of subtype A and G HIV type 1 in Nigeria, with geographical differences in their distribution. *AIDS Res Hum Retroviruses* **16**:315-25.
140. **Peeters, M., W. Janssens, K. Fransen, J. Brandful, L. Heyndrickx, K. Koffi, E. Delaporte, P. Piot, G. M. Gershy-Damet, and G. van der Groen.** 1994. Isolation of simian immunodeficiency viruses from two sooty mangabeys in Cote d'Ivoire: virological and genetic characterization and relationship to other HIV type 2 and SIVsm/mac strains. *AIDS Res Hum Retroviruses* **10**:1289-94.
141. **Pellegrin, I., J. Izopet, J. Reynes, M. Denayrolles, B. Montes, J. L. Pellegrin, P. Massip, J. Puel, H. Fleury, and M. Segondy.** 1999. Emergence of zidovudine and multidrug-resistance mutations in the HIV-1 reverse transcriptase gene in therapy-naïve patients receiving stavudine plus didanosine combination therapy. STADI Group. *AIDS* **13**:1705-9.
142. **Perno, C. F., A. Cozzi-Lepri, C. Balotta, F. Forbici, M. Violin, A. Bertoli, G. Facchi, P. Pezzotti, G. Cadeo, G. Tositti, S. Pasquinucci, S. Pauluzzi, A. Scalzini, B. Salassa, A. Vincenti, A. N. Phillips, F. Dianzani, A. Appice, G. Angarano, L. Monno, G. Ippolito, M. Moroni, and A. d' Arminio Monforte.** 2001. Secondary mutations in the protease region of human immunodeficiency virus and virologic failure in drug-naïve patients treated with protease inhibitor-based therapy. *J Infect Dis* **184**:983-91. Epub 2001 Aug 30.

143. **Phillips, A. N., S. Staszewski, R. Weber, O. Kirk, P. Francioli, V. Miller, P. Vernazza, J. D. Lundgren, and B. Ledergerber.** 2001. HIV viral load response to antiretroviral therapy according to the baseline CD4 cell count and viral load. *JAMA* **286**:2560-7.
144. **Pieniazek, D., M. Rayfield, D. J. Hu, J. Nkengasong, S. Z. Wiktor, R. Downing, B. Biryahwaho, T. Mastro, A. Tanuri, V. Soriano, R. Lal, and T. Dondero.** 2000. Protease sequences from HIV-1 group M subtypes A-H reveal distinct amino acid mutation patterns associated with protease resistance in protease inhibitor-naïve individuals worldwide. HIV Variant Working Group. *Aids* **14**:1489-95.
145. **Poveda E, Blanco F, Garcia-Gasco P, Alcolea A, Briz V, Soriano V.** 2006. Successful rescue therapy with darunavir (TMC114) in HIV-infected patients who have failed several ritonavir-boosted protease inhibitors. *AIDS* 2006 Jul 13;20(11):1558-60.
146. **Preston A. Marx, Cristian Apetrei, Ernest Drucker .** 2004. AIDS as a zoonosis? Confusion over the origin of the virus and the origin of the epidemics *Journal of Medical Primatology* Vol. 33 Issue 5-6 Page 220 October 2004.
147. **Preston, B. D., B. J. Poiesz, and L. A. Loeb.** 1988. Fidelity of HIV-1 reverse transcriptase. *Science* **242**:1168-71.
148. **Preston, B. D., and J. P. Dougherty.** 1996. Mechanisms of retroviral mutation. *Trends Microbiol* **4**:16-21.
149. **Quan Y, Brenner BG, Marlink RG, Essex M, Kurimura T & Wainberg MA.** 2003. Drug resistance profiles of recombinant reverse transcriptases from human immunodeficiency virus type 1 subtypes A/E, B, and C. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2003; **19**:743-753.
150. **Quinones-Mateu, M. E., J. L. Albright, A. Mas, V. Soriano, and E. J. Arts.** 1998. Analysis of pol gene heterogeneity, viral quasispecies, and drug resistance in individuals infected with group O strains of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* **72**:9002-15.
151. **Race, E., E. Dam, V. Obry, S. Paulous, and F. Clavel.** 1999. Analysis of HIV cross-resistance to protease inhibitors using a rapid single-cycle recombinant virus assay for patients failing on combination therapies. *AIDS* **13**:2061-8.
152. **Ray, N., Harrison, J. E., Blackburn, L. A., Martin, J. N., Deeks, S. G., Doms, R. W.** 2007. Clinical Resistance to Enfuvirtide Does Not Affect Susceptibility of Human Immunodeficiency Virus Type 1 to Other Classes of Entry Inhibitors. *J. Virol.* **81**: 3240-3250.

153. **Reeves, J. D., S. A. Gallo, N. Ahmad, J. L. Miamidian, P. E. Harvey, M. Sharron, S. Pohlmann, J. N. Sfakianos, C. A. Derdeyn, R. Blumenthal, E. Hunter, and R. W. Doms.** 2002. Sensitivity of HIV-1 to entry inhibitors correlates with envelope/coreceptor affinity, receptor density, and fusion kinetics. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:16249-54. Epub 2002 Nov 20.
154. **Reid, P., H. MacInnes, M. Cong, W. Heneine, and J. G. Garcia-Lerma.** 2005. Natural resistance of human immunodeficiency virus type 2 to zidovudine. *Virology*. 2005 Jun 5;336(2):251-64.
155. **Richard, N., M. Juntilla, A. Abraha, K. Demers, E. Paxinos, J. Galovich, C. Petropoulos, C. C. Whalen, F. Kyeyune, D. Atwine, C. Kityo, P. Mugenyi, and E. J. Arts.** 2004. High prevalence of antiretroviral resistance in treated Ugandans infected with non-subtype B human immunodeficiency virus type 1. *AIDS Res Hum Retroviruses* **20**:355-64.
156. **Roberts, J. D., K. Bebenek, and T. A. Kunkel.** 1988. The accuracy of reverse transcriptase from HIV-1. *Science* **242**:1171-3.
157. **Roberts, N. A.** 1995. Drug-resistance patterns of saquinavir and other HIV proteinase inhibitors. *Aids* **9**:27-S32.
158. **Robertson, D. L., J. P. Anderson, J. A. Bradac, J. K. Carr, B. Foley, R. K. Funkhouser, F. Gao, B. H. Hahn, M. L. Kalish, C. Kuiken, G. H. Learn, T. Leitner, F. McCutchan, S. Osmanov, M. Peeters, D. Pieniazek, M. Salminen, P. M. Sharp, S. Wolinsky, and B. Korber.** 2000. HIV-1 nomenclature proposal. *Science* **288**:55-6.
159. **Robertson, D. L., P. M. Sharp, F. E. McCutchan, and B. H. Hahn.** 1995. Recombination in HIV-1. *Nature* **374**:124-6.
160. **Rodes, B., A. Holguin, V. Soriano, M. Dourana, K. Mansinho, F. Antunes, and J. Gonzalez-Lahoz.** 2000. Emergence of drug resistance mutations in human immunodeficiency virus type 2-infected subjects undergoing antiretroviral therapy. *J Clin Microbiol* **38**:1370-4.
161. **Ross, L., K. Henry, D. Paar, P. Salvato, M. Shaefer, R. Fisher, Q. Liao, and M. St Clair.** 2001. Thymidine-analog and multi-nucleoside resistance mutations are observed in both zidovudine-naïve and zidovudine-experienced subjects with viremia after treatment with stavudine-containing regimens. *J Hum Virol* **4**:217-22.

162. **Rusconi, S., S. La Seta Catamancio, P. Citterio, S. Kurtagic, M. Violin, C. Balotta, M. Moroni, M. Galli, and A. d'Arminio-Monforte.** 2000. Susceptibility to PNU-140690 (Tipranavir) of human immunodeficiency virus type 1 isolates derived from patients with multidrug resistance to other protease inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother* **44**:1328-32.
163. **Salminen, M. O., C. Koch, E. Sanders-Buell, P. K. Ehrenberg, N. L. Michael, J. K. Carr, D. S. Burke, and F. E. McCutchan.** 1995. Recovery of virtually full-length HIV-1 provirus of diverse subtypes from primary virus cultures using the polymerase chain reaction. *Virology* **213**:80-6.
164. **Servais, J., C. Lambert, E. Karita, D. Vanhove, A. Fischer, T. Baurith, J. C. Schmit, F. Schneider, R. Hemmer, and V. Arendt.** 2004. HIV type 1 pol gene diversity and archived nevirapine resistance mutation in pregnant women in Rwanda. *AIDS Res Hum Retroviruses* **20**:279-83.
165. **Simon, F., P. Mauciere, P. Roques, I. Loussert-Ajaka, M. C. Muller-Trutwin, S. Saragosti, M. C. Georges-Courbot, F. Barre-Sinoussi, and F. Brun-Vezinet.** 1998. Identification of a new human immunodeficiency virus type 1 distinct from group M and group O. *Nat Med* **4**:1032-7.
166. **Slatkin M & Maddison WP.** 1989. A cladistic measure of gene flow inferred from the phylogenies of alleles. *Genetics* 1989; **123**:603-613.
167. **Slatkin M & Maddison WP.** 1990. Detecting isolation by distance using phylogenies of genes. *Genetics* 1990; **126**:249-260.
168. **Shulman, N. S., M. D. Hughes, M. A. Winters, R. W. Shafer, A. R. Zolopa, N. S. Hellmann, M. Bates, J. M. Whitcomb, and D. A. Katzenstein.** 2002. Subtle decreases in stavudine phenotypic susceptibility predict poor virologic response to stavudine monotherapy in zidovudine-experienced patients. *J Acquir Immune Defic Syndr* **31**:121-7.
169. **Shulman, N. S., R. J. Bosch, J. W. Mellors, M. A. Albrecht, and D. A. Katzenstein.** 2003. Genetic correlates of phenotypic hypersusceptibility to efavirenz among 446 baseline isolates from five ATCG studies. *Antiviral therapy* **8**:S48.
170. **Snoeck, J., S. Van Dooren, K. Van Laethem, I. Derdelinckx, E. Van Wijngaerden, E. De Clercq, and A. M. Vandamme.** 2002. Prevalence and origin of HIV-1 group M subtypes among patients attending a Belgian hospital in 1999. *Virus Res* **85**:95-107.

171. **Soares, E. A., R. P. Santos, J. A. Pellegrini, E. Sprinz, A. Tanuri, and M. A. Soares.** 2003. Epidemiologic and molecular characterization of human immunodeficiency virus type 1 in southern Brazil. *J Acquir Immune Defic Syndr* **34**:520-6.
172. **Starnes, M. C., and Y. C. Cheng.** 1989. Human immunodeficiency virus reverse transcriptase-associated RNase H activity. *J Biol Chem* **264**:7073-7.
173. **St Clair, M. H., J. L. Martin, G. Tudor-Williams, M. C. Bach, C. L. Vavro, D. M. King, P. Kellam, S. D. Kemp, and B. A. Larder.** 1991. Resistance to ddI and sensitivity to AZT induced by a mutation in HIV-1 reverse transcriptase. *Science* **253**:1557-9.
174. **Sungkanuparph S, Groger RK, Overton ET, Fraser VJ, Powderly WG.** 2006. Persistent low-level viraemia and virological failure in HIV-1-infected patients treated with highly active antiretroviral therapy. *HIV Med.* 2006 Oct;7(7):437-41.
175. **Swofford DL.** PAUP* 4.0: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods). Edited by Editor|. Year|; p.^pp. Pages|. City|: Publisher|.
176. **Tebit DM, Ganame J, Sathiandee K, Nagabila Y, Coulibaly B & Krausslich HG.** 2006. Diversity of HIV in rural Burkina Faso. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2006; **43**:144-152.
177. **Temesgen Z, Feinberg JE** 2006. Drug evaluation: bevirimat--HIV Gag protein and viral maturation inhibitor. *Curr Opin Investig Drugs.* 2006 Aug;7(8):759-65.
178. **Triques K, Bourgeois A, Vidal N, Mpoudi-Ngole E, Mulanga-Kabeya C, Nzilambi N, Torimiro N, Saman E, Delaporte E & Peeters M.** 2000. Near-full-length genome sequencing of divergent African HIV type 1 subtype F viruses leads to the identification of a new HIV type 1 subtype designated K. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2000; **16**:139-151.
179. **UNAIDS report 2006 of HIV.**
180. **Van der Ende, M. E., J. M. Prins, K. Brinkman, M. Keuter, J. Veenstra, S. A. Danner, H. G. Niesters, A. D. Osterhaus, and M. Schutten.** 2003. Clinical, immunological and virological response to different antiretroviral regimens in a cohort of HIV-2-infected patients. *Aids* **17**:S55-61.
181. **Vergne, L., C. T. Kane, C. Laurent, N. Diakhate, N. F. Gueye, P. M. Gueye, P. S. Sow, M. A. Faye, F. Liegeois, A. Ndir, I. Laniece, M. Peeters, I. Ndoeye, S. Mboup, and E. Delaporte.** 2003. Low rate of genotypic HIV-1 drug-resistant strains in the Senegalese government initiative of access to antiretroviral therapy. *AIDS* **17**:S31-8.

182. Vergne, L., D. Paraskevis, A. M. Vandamme, E. Delaporte, and M. Peeters. 2003. High prevalence of CRF02_AG and many minor resistance-related mutations at the protease gene among HIV-infected treatment-naïve immigrants in Madrid. *AIDS* 17:1105-7.
183. Vergne, L., G. Malonga-Mouellet, I. Mistoul, R. Mavoungou, H. Mansaray, M. Peeters, and E. Delaporte. 2002. Resistance to antiretroviral treatment in Gabon: need for implementation of guidelines on antiretroviral therapy use and HIV-1 drug resistance monitoring in developing countries. *J Acquir Immune Defic Syndr* 29:165-8.
184. Vergne, L., M. Peeters, E. Mpoudi-Ngole, A. Bourgeois, F. Liegeois, C. Toure Kane, S. Mboup, C. Mulanga-Kabeya, E. Saman, J. Jourdan, J. Reynes, and E. Delaporte. 2000. Genetic diversity of protease and reverse transcriptase sequences in non-subtype-B human immunodeficiency virus type 1 strains: evidence of many minor drug resistance mutations in treatment-naïve patients. *J Clin Microbiol* 38:3919-25.
185. Walter, H., B. Schmidt, M. Werwein, E. Schwingel, and K. Korn. 2002. Prediction of abacavir resistance from genotypic data: impact of zidovudine and lamivudine resistance in vitro and in vivo. *Antimicrob Agents Chemother* 46:89-94.
186. Wainberg, M. A., L. Lewis, H. Salomon, Z. Gu, A. Keller, N. Cammack, J. Goldsmith, J. Church, B. Spira, S. Wheeler, and P. Pizzo. 1996. Resistance to (-)-2',3'-dideoxy-3'-thiacytidine (3TC) in HIV-1 isolated from paediatric patients. *Antivir Ther* 1:98-104.
187. Wainberg, M. A., M. D. Miller, Y. Quan, H. Salomon, A. S. Mulato, P. D. Lamy, N. A. Margot, K. E. Anton, and J. M. Cherrington. 1999. In vitro selection and characterization of HIV-1 with reduced susceptibility to PMPA. *Antivir Ther* 4:87-94.
188. Wasi, C., B. Herring, S. Raktham, S. Vanichseni, T. D. Mastro, N. L. Young, H. Rubsamen-Waigmann, H. von Briesen, M. L. Kalish, C. C. Luo, and *et al.* 1995. Determination of HIV-1 subtypes in injecting drug users in Bangkok, Thailand, using peptide-binding enzyme immunoassay and heteroduplex mobility assay: evidence of increasing infection with HIV-1 subtype E. *AIDS* 9:843-9.
189. Wei, X., J. M. Decker, H. Liu, Z. Zhang, R. B. Arani, J. M. Kilby, M. S. Saag, X. Wu, G. M. Shaw, and J. C. Kappes. 2002. Emergence of resistant human immunodeficiency virus type 1 in patients receiving fusion inhibitor (T-20) monotherapy. *Antimicrob Agents Chemother* 46:1896-905.

190. **Weidle, P. J., C. M. Kityo, P. Mugenyi, R. Downing, A. Kebba, D. Pieniazek, R. Respass, K. Hertogs, V. De Vroey, P. Dehertogh, S. Bloor, B. Larder, and E. Lackritz.** 2001. Resistance to antiretroviral therapy among patients in Uganda. *J Acquir Immune Defic Syndr* **26**:495-500.
191. **Wild, C. T., D. C. Shugars, T. K. Greenwell, C. B. McDanal, and T. J. Matthews.** 1994. Peptides corresponding to a predictive alpha-helical domain of human immunodeficiency virus type 1 gp41 are potent inhibitors of virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**:9770-4.
192. **Winston, A., S. Mandalia, D. Pillay, B. Gazzard, and A. Pozniak.** 2002. The prevalence and determinants of the K65R mutation in HIV-1 reverse transcriptase in tenofovir-naïve patients. *AIDS* **16**:2087-9.
193. **Wooley, D. P., R. A. Smith, S. Czajak, and R. C. Desrosiers.** 1997. Direct demonstration of retroviral recombination in a rhesus monkey. *J Virol* **71**:9650-3.
194. **Xu, L., A. Pozniak, A. Wildfire, D. Ratcliffe, J. Workman, A. Joall, E. Smit, P. A. Cane, and D. Pillay.** 2004. Evolution of HR1 and HR2 Mutations in HIV-1 gp41 Associated with Long-term Enfuvirtide Therapy. 11th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, San Francisco, CA **Abstract 659**.
195. **Yahi, N., C. Tamalet, C. Tourres, N. Tivoli, and J. Fantini.** 2000. Mutation L210W of HIV-1 reverse transcriptase in patients receiving combination therapy. Incidence, association with other mutations , and effects on the structure of mutated reverse transcriptase. *J Biomed Sci* **7**:507-13.
196. **Yang, C., M. Li, R. D. Newman, Y. P. Shi, J. Ayisi, A. M. van Eijk, J. Otieno, O. Misore, R. W. Steketee, B. L. Nahlen, and R. B. Lal.** 2003. Genetic diversity of HIV-1 in western Kenya: subtype-specific differences in mother-tochild transmission. *AIDS* **17**:1667-74.
197. **Zagury, J. F., G. Franchini, M. Reitz, E. Collalti, B. Starcich, L. Hall, K. Fargnoli, L. Jagodzinski, H. G. Guo, F. Laure, and *et al.*** 1988. Genetic variability between isolates of human immunodeficiency virus (HIV) type 2 is comparable to the variability among HIV type 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**:5941-5.
198. **Zaidi, I., H. Weinstock, T. Woods, and e. al.** 2001. Prevalence of mutations associated with anti-retroviral drug resistance among HIV-1 infected persons in 10 US cities, 1997-2000. Abstracts of the 5th International Workshop on Drug Resistance and Treatment Strategies, Scottsdale, Arizona.
199. **Zhu, T., N. Wang, A. Carr, D. S. Nam, R. Moor-Jankowski, D. A. Cooper, and D. D. Ho.** 1996. Genetic characterization of human immunodeficiency virus type 1 in blood and genital secretions: evidence for viral compartmentalization and selection during sexual transmission. *J Virol* **70**:3098-107.